

**Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und
Rehabilitation**

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dipl. Ing. Volkmar Jansson

Stimulation von Fibroblasten zu Tenozyten mit Wachstumsfaktoren

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Martin Bendiks
aus Starnberg
2019



**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter E. Müller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Ries

PD Dr. Attila Aszódi

PD Dr. Andreas Ficklscherer

Prof. Dr. Matthias Schieker

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Thomas Niethammer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1. Sehnenverletzungen.....	6
1.2. Die Rotatorenmanschettenruptur.....	7
1.2.1. Die Rotatorenmanschette.....	7
1.2.2. Die Verletzung der Rotatorenmanschette.....	8
1.2.3. Die Spontanheilung.....	10
1.2.4. Therapie.....	11
1.2.4.1. Konservative Methoden.....	11
1.2.4.2. Arthroskopische Naht.....	12
1.2.4.3. Zelluläre oder azelluläre Therapie.....	12
1.3. Aufbau von Sehnen	13
1.3.1. Tenozyten	14
1.3.2. Extrazelluläre Matrix von Sehnen.....	16
1.4. Fibroblasten	16
1.5. Tissue Engineering von Sehnen.....	17
1.5.1. Zellarten im Tissue Engineering.....	17
1.5.2. Mechanische Stimulation im TTE.....	18
1.5.3. Wachstumsfaktoren im TTE.....	18
1.6. Fragestellung	20
2. Material und Methodik	21
2.1. Methoden	21
2.1.1. Zellkultur	21
2.1.1.1. Zellflaschen und Material.....	21
2.1.1.2. CO ₂ Inkubator.....	21
2.1.1.3. Medium und Mediumwechsel.....	21
2.1.1.4. Ablösen und Waschen von Zellen.....	21
2.1.1.5. Einfrieren und Auftauen von Zellen	22
2.1.2. Optische Methoden	22
2.1.2.1. Zellzahlbestimmung.....	22
2.1.2.2. Fotografie.....	23
2.1.3. Stimulation mit Wachstumsfaktoren	23
2.1.3.1. IGF-1.....	23
2.1.3.2. PDGF-BB	23
2.1.3.3. FGF.....	23
2.1.3.4. BMP-13.....	23
2.1.4. WST-1 Test.....	24

2.1.5. Analyse der Genexpression	24
2.1.5.1. Gewinnung von RNA	24
2.1.5.2. Umschreiben in cDNA.....	25
2.1.5.3. Light Cycler	26
2.1.5.4. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
2.1.5.5. Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2. Material	29
2.2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	29
2.2.2. Chemikalien und Reagenzien.....	30
2.2.3. Zellen – Fibroblasten	31
2.2.4. Primer	32
2.2.5. Computerprogramme und Software	32
3. Statistische Methoden	33
4. Versuchsaufbau.....	34
5. Ergebnisse.....	35
5.1. Morphologie	35
5.1.1. Ausgangsstatus	35
5.1.2. Vergleich an Tag 3	36
5.1.3. Vergleich an Tag 7	36
5.1.4. Vergleich an Tag 10.....	40
5.1.5. Mediumwechsel.....	44
5.2. Zellproliferation	45
5.2.1. Zellzahl.....	45
5.2.1.1. Tag 3.....	46
5.2.1.2. Tag 7	47
5.2.1.3. Tag 10	48
5.2.2. Extinktion im WST-1 Versuch	49
5.2.2.1. Tag 1.....	50
5.2.2.2. Tag 3.....	51
5.2.2.3. Tag 7	52
5.2.2.4. Tag 10	53
5.3. Genexpression.....	54
5.3.1. Qualitativer Gennachweis	54
5.3.2. Quantitativer Gennachweis	56
5.3.2.1. GAPDH.....	56
5.3.2.2. Kollagen Typ I	58
5.3.2.3. Kollagen Typ III	59

5.3.2.4.	Tenascin C.....	61
5.3.2.5.	Decorin.....	62
5.3.2.6.	Kollagen Typ II.....	64
5.3.2.7.	Osteocalcin	65
5.3.2.8.	Überblick Ergebnisse quantitative Genexpression.....	67
6.	Diskussion.....	68
6.1.	Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	68
6.2.	Diskussion der Methoden.....	69
6.3.	Diskussion der Ergebnisse.....	70
6.4.	Einordnung in die Literatur.....	72
6.5.	Limitationen der Studie	73
6.6.	Ausblick.....	74
7.	Zusammenfassung	77
8.	Literaturverzeichnis.....	79
9.	Anhang	85
9.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	85
9.2.	Abbildungsverzeichnis.....	87
10.	Danksagung.....	89

1. Einleitung

1.1. Sehnenverletzungen

Sehnen- und Bandverletzungen zählen zu den häufigsten Krankheitsbildern im orthopädischen und unfallchirurgischen Alltag. Allein in den USA werden jährlich etwa 30 Milliarden \$ für muskuloskelettale Erkrankungen ausgegeben (1). Verletzungen der Weichteile des muskuloskelettalen Apparates des Menschen treten nach einer Studie der Edinburgh Orthopaedic Trauma Unit, die einzige medizinische Versorgung für eine Population von etwa einer halben Millionen Personen, über einen Beobachtungszeitraum von 5 Jahren mit einer jährlichen Inzidenz von 106/100.000 Personen auf (2). Darunter befinden sich Meniskusverletzungen, welche 22,4% der erfassten Patienten betrafen. Der Großteil, also 77,6% der weichteiligen Verletzungen des muskuloskelettalen Systems, betraf Sehnen und Bänder.

Die häufigste Ruptur trat an der Achillessehne auf, mit einem Anteil von 10,7% an den Verletzungen und einer jährlichen Inzidenz von 11,33/100.000. Es folgten der vordere Kreuzbandriss (7,6% bei 8,06/100.000), die Ruptur des Innenbandes des Kniegelenks (4,9% bei 5,02/100.000) und die Rotatorenmanschettenruptur (RMR) an der Schulter mit einem jährlichen Neuauftreten von 3,73/100.000 und einem Anteil von 3,75% an den Gesamtverletzungen. Ebenso zeigte sich, dass die Kreuzbandruptur und der Innenbandriss mit einem Altersdurchschnitt bei circa 30 Jahren und einem Geschlechterverhältnis von 3:1 (m:w) sich erheblich im Hinblick auf das Patientenkollektiv der RMR unterscheiden. Hingegen die RMR fällt mit einem ausgeglichenen Verhältnis zwischen Männern und Frauen und einem Durchschnittsalter über 50 Jahren auf. Auch die Achillessehnenruptur findet tendenziell eher in einem fortgeschrittenen Alter über 40 Jahren statt.

Insgesamt ist die hohe klinische Relevanz von Sehnenverletzungen mit einem Anteil von über $\frac{3}{4}$ an den gesamten weichteiligen Läsionen des Bewegungsapparates und einem altersspezifischen Verteilungsmuster bezüglich der einzelnen Rupturen zu erkennen.

1.2. Die Rotatorenmanschettenruptur

1.2.1. Die Rotatorenmanschette

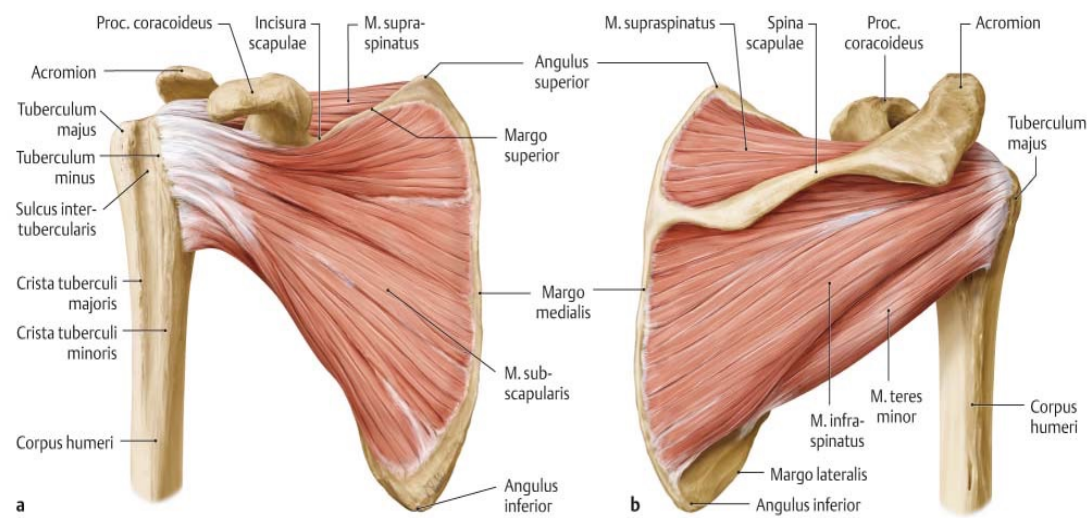


Abbildung 1: Rechte Schulter a) von ventral b) von dorsal aus (3)

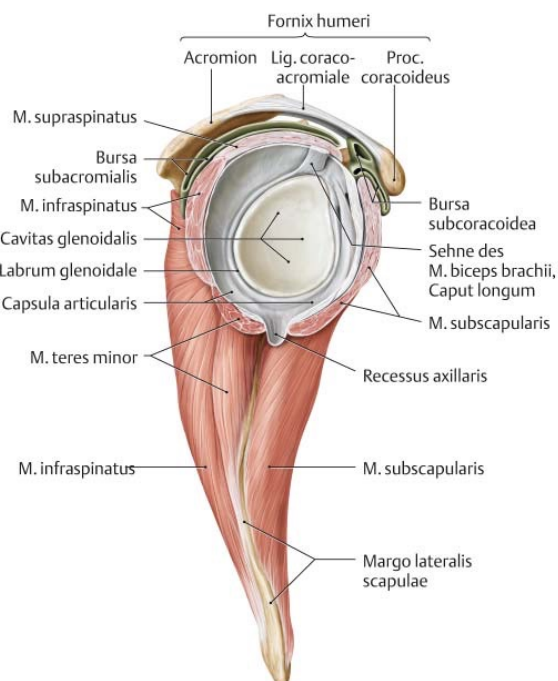


Abbildung 2: Rechte Schulter von lateral aus (3)

Primär wird die Rotatorenmanschette (RM) an der Schulter aus dem Musculus (M.) supraspinatus, M. infraspinatus, M. subscapularis und M. teres minor gebildet. Die Abduktion ist Aufgabe des M. supraspinatus, der besonders zu Beginn der Abduktion entscheidend im Zusammenspiel mit dem M. deltoideus ist. Neben dem M.

supraspinatus haben M. teres minor und M. infraspinatus ihren Ansatz auch am Tuberculum majus und sind für die Außenrotation zuständig. Mit seinem Ansatz am Tuberculum minus bewirkt der M. subscapularis eine Innenrotation im Schultergelenk. Durch ihre umspannende Anatomie schützen die Muskeln den Humeruskopf vor Luxation. Ebenso verhindern sie durch antagonistische Wirkung ein in kraniale Richtung Wandern des Humeruskopfes aufgrund des Zuges des M. deltoideus und stabilisieren, sowie zentrieren so das Gelenk in der Cavitas glenoidalis (4). Durch ihre anatomische Nähe und ihre stabilisierenden Funktion kann auch die Sehne des M. biceps brachii, Caput longum zur RM gezählt werden (5, 6).

1.2.2. Die Verletzung der Rotatorenmanschette

Rotatorenmanschettenrupturen zählen zu den häufigsten Erkrankungen des Bewegungsapparates, betreffen 40% der Personen in der Gruppe der über 60 Jährigen. Durch die ansteigende Lebenserwartung weltweit, insbesondere in den westlichen Industrienationen, wird die RMR eine weiter steigende Bedeutung für die Bevölkerung und im Gesundheitswesen erfahren (7). Ebenso steigt die Prävalenz der RMR in der Bevölkerung bei steigendem Alter auf über 70% der über 70 Jährigen an, wie Studien an Toten zeigen (8). Nicht selten führt eine RMR bei den Patienten zu einer erheblichen Einschränkung der Alltagstauglichkeit ihrer Schulter und zu starken Schmerzen.

Während die RMR in jüngeren Jahren meistens traumatisch bedingt ist (9), so steigt mit steigendem Lebensalter der Anteil degenerativ bedingter Rupturen im anatomisch engen Subacromialraum stetig an. Neer nahm an, dass diese in 95% durch ein Impingement bedingt seien (10, 11), welches die Supraspinatus Sehne aufreibe.

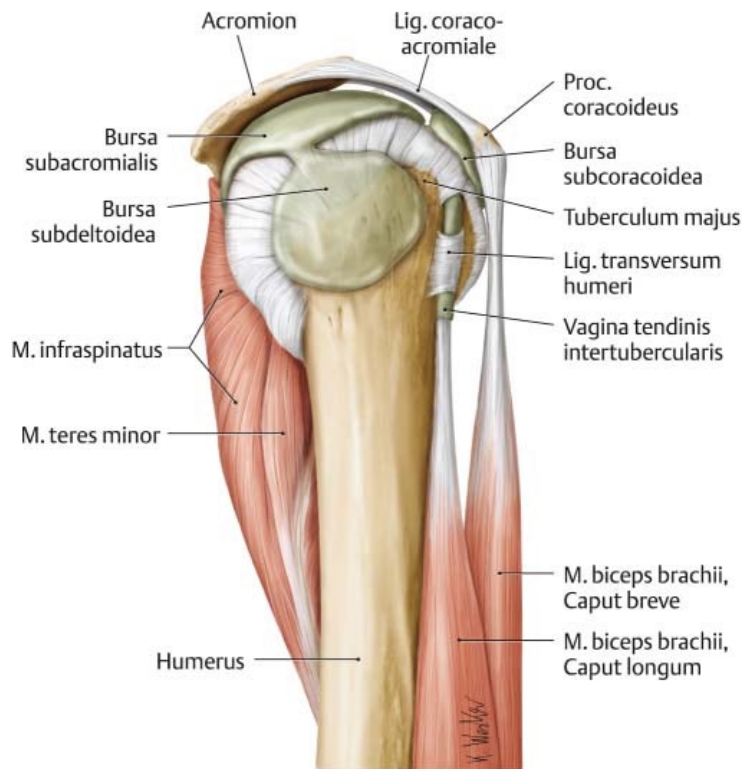


Abbildung 3: Die Schulter von lateral aus (3)

Es werden extrinsische und intrinsische Ursachen einer Rotatorenmanschettenruptur angenommen (12). Extrinsisch durch ein Reiben der Suprapinatussehne bedingt durch einen verengten Subacromialraum. Dabei spielt auch die Kranialisierung des Humeruskopfes eine wichtige Rolle (13). In diesem Zusammenhang sind die Verdickung des Ligamentum coracoacromiale und die Verdickung der Bursa durch eine Bursitis subacromialis (14) wichtige Faktoren. Unter intrinsischen Ursachen versteht man den degenerativen Umbau der Sehne, durch lipöse, fibröse Infiltrationen oder Hydroxyapatitmikrokalzifikationen sowie einen mukoiden Umbau (14, 15). Diese schwächen die Struktur, sodass ein Mikrotrauma genügt um den Riss der Sehne auszulösen.

1.2.3. Die Spontanheilung

Der Spontanheilungsverlauf von Sehnen, insbesondere an der Rotatorenmanschette ist sehr limitiert und führt kaum zu einem guten klinischen Outcome. Gründe hierfür sind die geringe Vaskularisierung von Sehnen, speziell eine weitestgehende Avaskularität der Supraspinatussehne (16) und der niedrige Stammzellgehalt für die Regeneration (17) der Läsionen in der Sehne an Ort und Stelle.

Der natürliche Heilungsverlauf von Sehnenrissen teilt sich nach Sharma et al. (18) meist, jedoch nicht immer, in mehreren Phasen. Zunächst kommt es zur Entzündungsphase. Hierbei wandern Erythrozyten und neutrophile Granulozyten in die Läsion ein. In den ersten 24h phagozytieren Monozyten und Makrophagen nekrotisches Material. Die Gefäßpermeabilität, Angiogenese (bedingt unter anderem durch Vaskular Endothelial Growth Factor (VEGF)), Proliferation von Tenozyten und das weitere Rekrutieren von Entzündungszellen steigen durch freigesetzte Mediatoren an. Tenozyten wandern in den Defekt ein und beginnen mit der Synthese von Kollagen Typ III.

Nach mehreren Tagen beginnt die Reparations-Phase. Hier erlebt die Kollagen Typ III Synthese ihren Höhepunkt. Der Wassergehalt und die Glykosaminoglykankonzentration bleiben für mehrere Wochen erhöht.

Schließlich nach ungefähr 6 Wochen beginnt die Remodelling-Phase. Nun wird das Gewebe in Form und Umfang verändert. Die Zellzahl sowie Kollagensynthese und das Ödem zeigen sich rückläufig. Tenozyten und Kollagen ordnen sich in Zugrichtung an und es wird verhältnismäßig mehr Kollagen Typ I produziert.

Dann tritt etwa 10 Wochen nach dem Ereignis die Erhaltungsphase ein, in der der Metabolismus der Tenozyten und die Vaskularität über den Zeitraum eines Jahres zurückgehen und sich keine weiteren Veränderungen mehr zeigen.

Allgemein kann die Sehnenheilung intrinsisch durch Epitenon- und Endotenon-Tenozyten oder extrinsisch durch einwandernde Zellen aus Synovia oder des umgebenden Gewebes der Sehne angestoßen werden. Tenoblasten des Epitenons initiieren den Heilungsprozess durch Proliferation und Einwanderung (19). Endotenon-Tenozyten produzieren mehr und belastbareres Kollagen als Epitenon-Tenozyten (20). Ebenso synthetisieren Fibroblasten des Epitenons und Tenozyten Kollagen während der Heilung. Zellen des Epitenons produzieren früher Kollagen als Zellen des Endotenons (21), was ein weiterer sehr interessanter Aspekt hinsichtlich der Regeneration ist. Der Anteil der einzelnen Zelltypen, die an der Zellheilung beteiligt sind, dürfte wohl vom

Trauma, der Sehne, des umgebenden Gewebes und der Belastung der Sehne und deren Zusammenspiel abhängen (22). Interessanterweise zeigt die intrinsische Heilung biomechanische Vorteile gegenüber der extrinsischen Reparatur, was die Gleitfähigkeit und Verklebungen betrifft, wobei an der Rotatorenmanschette die extrinsische Defektheilung vorherrscht (18).

	Inflammatory	Reparative (proliferation)	Remodeling (consolidation & maturation)
Cells & Matrix Changes	Platelets Neutrophils Monocytes Erythrocytes Circulation-derived mesenchymal stem cells	↑ Cellularity and matrix production Collagen type III Activation of local tendon stem/progenitor cells	↑ Cellularity and matrix production Collagen type III Collagen type I
Molecular Changes	Interleukin-6, -1β bFGF IGF-1 PDGF TGFβ VEGF	bFGF GDF-5, -6, and -7 IGF-1 PDGF TGFβ VEGF	GDF-5, -6, and -7 IGF-1 TGFβ

Abbildung 4: Verlauf der Sehnenheilung (aus (23))

1.2.4. Therapie

1.2.4.1. Konservative Methoden

Grundsätzlich werden RMR heutzutage operativ versorgt. Ein konservativer Therapieversuch mit Physiotherapie, nicht steroidalen Antirheumatika (NSAR) (24) und Cortison-Derivaten systemisch und lokal ist möglich. Ziel der Physiotherapie ist es, die intakten Muskeln der Rotatorenmanschette zu fördern und zu aktivieren. Dadurch sollte der Humerus im Schultergelenk zentriert werden und eine höhere Stabilität des gesamten Gelenks erreicht werden, um ein nach oben Wandern des Humeruskopfes und eine anschließende Defektarthropathie zu verhindern (25). Das klinische Outcome der Physiotherapie wird durch eine intakte Restmuskulatur positiv beeinflusst (26, 27). NSAR und Cortison-Injektionen konnten die Schmerzen reduzieren, jedoch nicht die ursprüngliche Funktionalität wiederherstellen. Hinsichtlich der Applikation ergab sich in einer Studie kein Unterschied, ob das Cortison lokal oder systemisch verabreicht wurde (28).

1.2.4.2. Arthroskopische Naht

Der heutige Standard ist die arthroskopische Versorgung des Sehnenrisses mit einer Naht. Die offene Schulterchirurgie wurde weitestgehend verlassen. Leider sind die wichtigsten präoperativen prognostischen Faktoren die Größe des Ausgangsdefekts und die Qualität der Sehne, welche häufig sehr niedrig ist (29) und daher schwankt die Rerupturrate je nach Studie und entsprechenden Ausgangssituationen zwischen 11% und 94%.

1.2.4.3. Zelluläre oder azelluläre Therapie

Im Hinblick auf ein optimales Ergebnis ist es sinnvoll die Ausgangsbedingungen, insbesondere die Sehnenqualität, und den zellulären Heilungsverlauf neben der optimalen Operationstechnik zu verbessern. In aktuellsten Studien wird versucht mit Zelltherapie oder azellulären Bestandteilen eine Augmentation (künstliche Verstärkung) der genähten Sehne zu erreichen und dadurch ein besseres Outcome zu erzielen. Eine Möglichkeit stellt thrombozytenreiches Plasma dar (PRP). PRP enthält einen hohen Anteil an Thrombozyten, welche sobald sie aktiviert sind, Wachstumsfaktoren freisetzen, die die Heilung der Rotatorenmanschette verbessern und Schmerzen reduzieren sollen. Zu diesen Wachstumsfaktoren gehören Platelet derived growth factors (PDGF), welche sich positiv auf die Zellteilung auswirken, transforming growth factor beta (TGF- β), der die Kollagensynthese und den Aufbau fördert und vascular endothelial growth factor (VEGF), der die endotheliale Zellproliferation fördert (30). Außerdem werden Thrombozyten antiinflammatorische Fähigkeiten über proteaseactivated receptor 4 peptides zugeschrieben (31, 32). Warth et al. (33) zeigte in einer Metaanalyse, welche 11 Studien mit insgesamt 597 Patienten zusammenfasst, bezüglich des Vergleichs zwischen Rotatorenmanschettennaht mit oder ohne PRP keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der Rerupturrate. Jedoch bei Läsionen größer als 3cm in anterior-posterior Richtung wurde ein signifikanter Unterschied von PRP in Verbindung mit jeweils zweireihiger Naht bei der Rerupturrate mit MRT Untersuchungen publiziert (25,9% vs. 57,1%, $p=0,046$).

Ebenso interessant ist der Ansatz mit Scaffolds (Sehnenersatzmaterial) die Sehnenqualität zu steigern. Das Allograft GraftJacket aus azellularisierter Hautmatrix wurde bei RMR, von mehr als 3cm Größe bei zwei Sehnen, mit der konventionellen Naht verglichen. 85% der mit dem Allograft Operierten sind im Vergleich zu 40% der konventionell versorgten Sehnen der Rotatorenmanschette nach 12-24 Monaten intakt

bei $p < 0,01$ (34). Die klinischen Scores von GraftJacket ($p = 0.035$) bezüglich Kraft fielen ebenso besser aus. Bei großen Defekten ($> 3\text{cm}$) scheint die Verwendung von GraftJacket vorteilhaft.

Wang et al. (35) publizierte einen Case Report über einen 20-jährigen Athleten der bei verdickter Rotatorenmanschettenpartialruptur mit einer ultraschall-gestützten autologen Tenozyteninjektion, die aus der Patella gewonnen wurde, therapiert wurde. Die Symptome besserten sich nach 12 Monaten erheblich und in den MRT-Aufnahmen zeigt sich die Partialruptur geheilt. Der Turner konnte danach seinen Sport wieder betreiben und sogar Wettkämpfe bestreiten.

1.3. Aufbau von Sehnen

Sehnen unterscheiden sich in ihrer Form je nach Funktion und Lage im Körper. Ihr äußerliches Erscheinungsbild ist weißlich glänzend und sie verbinden als zugfeste Strukturen Muskel und Knochen miteinander. Dadurch sorgen sie für die Kraftübertragung im Bewegungsapparat (18).

Umgeben werden sie vom Epitenon, das auch Peritendineum genannt wird. Im Epitenon befinden sich Stammzellen sowie Blutgefäße und Nerven. Die Kollagenfasern, überwiegend aus Kollagen Typ I, sind längs in Zugrichtung ausgerichtet (36).

Das Kollagen ist in Kollagenfibrillen angeordnet, die sich zusammen mit den Zellen der Sehne zu Kollagenfasern organisieren. Eine Gruppe von Kollagenfasern wird jeweils vom Endotenon umgeben und bildet das primäre Faserbündel, der auch Subfaszikel genannt wird. Die Faserbündel vereinigen sich zum Faszikel, welcher ebenso von Endotenon umgeben ist. Mehrere Faszikel ergeben zusammen das tertiäre Faserbündel, die wiederum von Endotenon umgeben sind. Schließlich wird aus diesen Strukturen die komplette Sehne gebildet. Das Epitenon bzw. Peritendineum umgibt die Sehne.

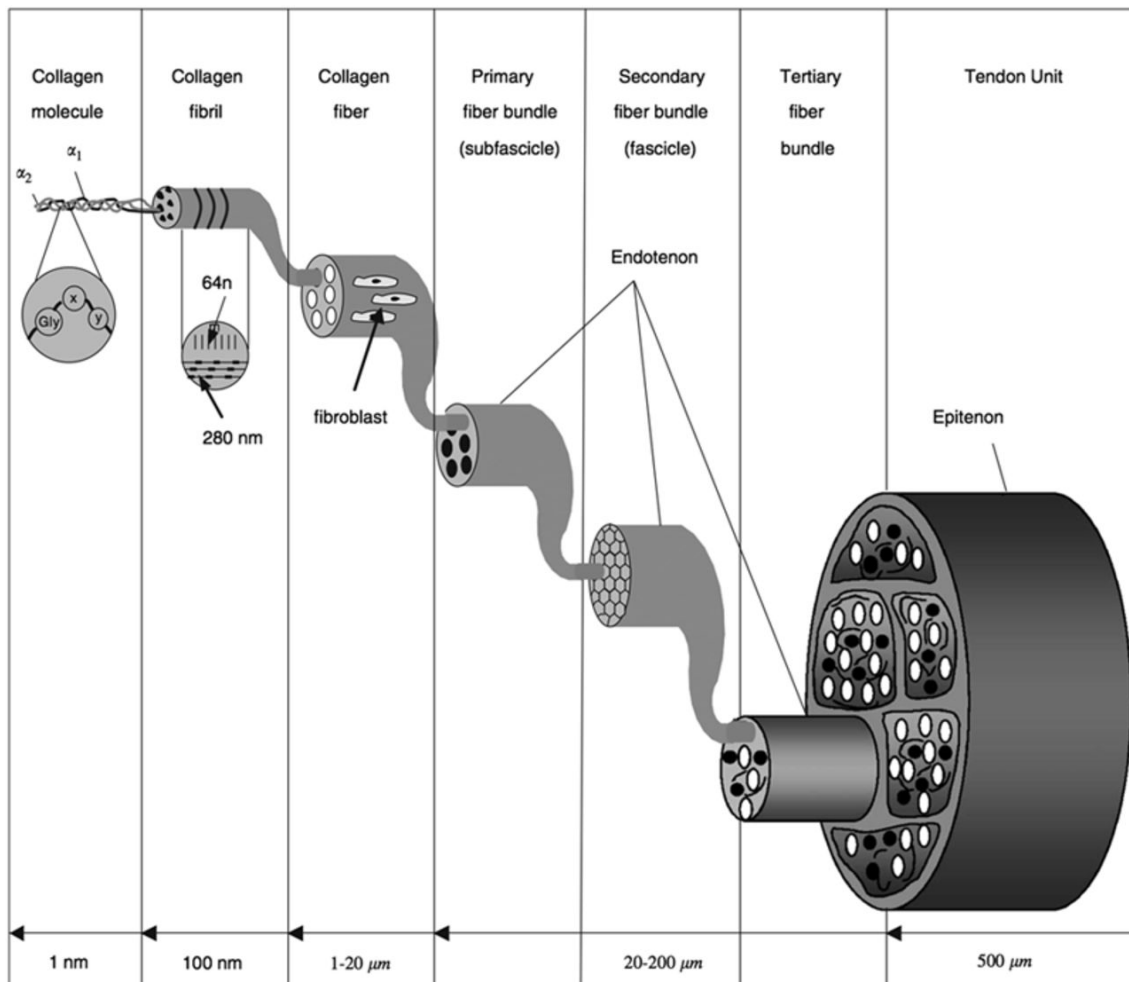


Abbildung 5: Schematischer Aufbau einer Sehne (aus (37))

1.3.1. Tenozyten

Die Zellen der Sehne sind die Tenozyten und Tenoblasten. Sie produzieren die Extrazelluläre Matrix (EZM) und liegen in ihr. Tenozyten und Tenoblasten sind flache Fibroblasten, die Aktin und Myosin enthalten (38). Tenoblasten sind unreife Tenozyten und zeigen sich spindelförmig mit vielen Zellorganellen, was für ihre hohe metabolische Aktivität spricht. Wenn sie altern, dann werden sie länger und sie entwickeln sich zu Tenozyten mit einem niedrigeren Kern/Plasmaverhältnis und einer geringeren metabolischen Aktivität. Tenoblasten und Tenozyten stellen mehr als 90% der Zellen in der Sehne (18). Der Rest sind vor allem Chondrozyten an den Knochenansätzen und Synovialzellen der Sehnenscheide. Die Proliferation der Tenozyten wird durch Tenomodulin reguliert, welches auch an der Ausbildung von Kollagenfibrillen beteiligt ist (39).

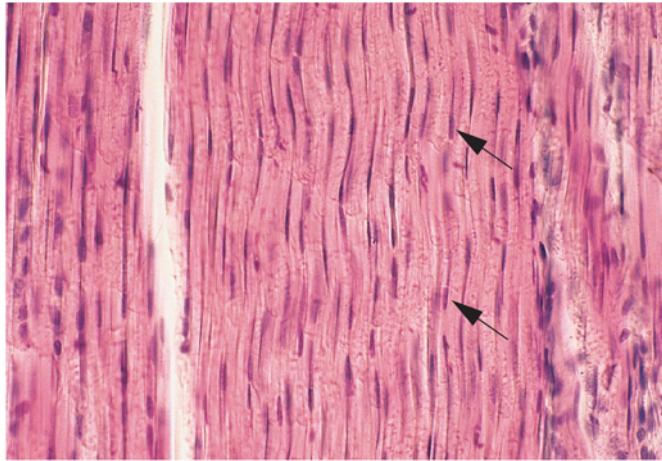


Abb. 7.8 Sehne, längs geschnitten. Zwischen den leicht gewellt verlaufenden Kollagenfasern der Sehne liegen die Sehnenzellen (Fibroblasten der Sehne = Tenozyten) mit abgeflachten Kernen (→). Mensch; H.E.-Färbung; Vergr. 250-fach. Deller, Welsch: Sobotta Lehrbuch Histologie, 4. A., Elsevier GmbH 2014

Abbildung 6: Histologischer Schnitt durch eine Sehne (aus (38))

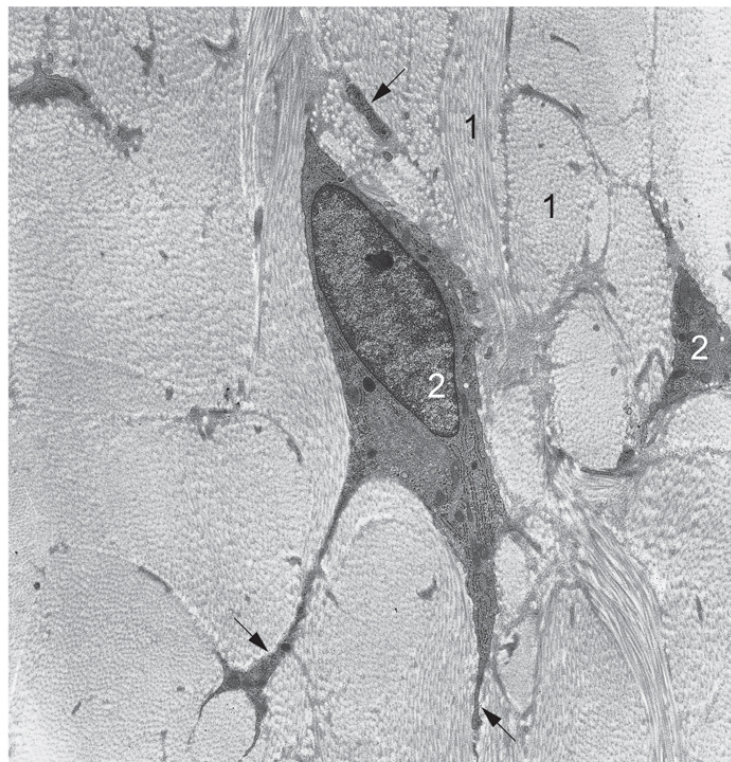


Abb. 7.10 Sehne, quer geschnitten, in einer EM-Aufnahme. 1 Bündel von Kollagenfibrillen, die überwiegend quer getroffen sind; 2 Sehnenzelle (Tenozyt) mit schlanken Fortsätzen (→). Ratte; Vergr. 7.680-fach. Deller, Welsch: Sobotta Lehrbuch Histologie, 4. A., Elsevier GmbH 2014

Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme Tenozyt (aus (38))

1.3.2. Extrazelluläre Matrix von Sehnen

Die EZM besteht zu 65-80% aus Kollagen Typ I und zu 2% aus Elastin, welches beides von Tenozyten produziert wird (40). Kollagen Typ I ist in einer Polypeptidkette mit Triple Helix aufgebaut. Diese vereinigt sich zu Fibrillen, Fasern, Faserbündel bis hin zur Sehne, wie oben beschrieben und in der Abbildung 37 dargestellt.

Tenascin-C ist unersetzlich für die Verbindung der Sehne mit dem Muskel und dem Knochen. Dabei spielt es eine wichtige Rolle bei der Ausrichtung und Bindung des Kollagens mit seinen Fibronectin Typ III Bindungen (41, 42).

Kollagen Typ III findet sich häufig in Verbindung mit Kollagen Typ I und ist an der Sehne meistens im Epitenon aufzufinden. Es spielt bei der Sehnenheilung, wie oben bereits erwähnt eine wichtige Rolle (18).

1.4. Fibroblasten

Fibroblasten sind ortsständige Zellen des Bindegewebes, welche hauptsächlich Extrazelluläre Matrix produzieren. Aktive Zellen werden eher Fibroblasten genannt, während Zellen mit niedrigerer Aktivität Fibrozyten bezeichnet werden. In der Gruppe der Fibroblasten findet sich eine große Heterogenität der Morphologie, da diese Zellen sich stark an das umgebende Gewebe anpassen. Sie zeigen sich als spindelförmige Zellen mit langen, dünnen Zellfortsätzen, welche zur Zell-Zellkommunikation und zur Anbindung an andere Zellen oder die Matrix genutzt werden. In aktiven Fibroblasten sind die Zellorganellen stark ausgeprägt und produzieren beispielsweise Kollagen, Elastin und unter anderem Glykoproteine. Das Zytoskelett besteht aus Aktin und Myosin II, was die Beweglichkeit der Zellen ermöglicht. Über das Aktin im Zytoskelett können Fibroblasten die Ausrichtung unter anderem von Kollagenfibrillen verändern (38). Fibroblasten sind an der Sehnenheilung als weniger differenzierte Tenozyten durch Einwanderung und Produktion von EZM, wie oben beschrieben entscheidend beteiligt (21).

1.5. Tissue Engineering von Sehnen

Das Tendon Tissue Engineering (TTE) befasst sich mit der in vitro Herstellung von Sehnen und deren EZM. Diese produzierten Gewebe sollen anschließend als Ersatzmaterial für die geschädigte Sehne implantiert werden und zu einer Heilung des Defekts am Patienten führen.

1.5.1. Zellarten im Tissue Engineering

Zellen müssen die Voraussetzung der Immunkompatibilität erfüllen. Deswegen würden sich autologe Zellen besonders eignen. Besonders naheliegend im Bereich des TTE wären die typischen Zellen der Sehne, in diesem Fall Tenozyten. Diese produzieren die EZM von Sehnen und stellen wie bereits ausgeführt einen Großteil der Zellen der Sehne (18). Im Rahmen der operativen Versorgung von Kreuzbandrupturen erfolgt der autologe Kreuzbandersatz beispielsweise mit Sehnen des M. semimembranosus oder M. semitendinosus. Dafür wird die komplette Sehne entnommen, was nicht mit einzelnen Zellen praktiziert wird (43). Das Entfernen einer dieser Sehnen zur Gewinnung von Tenozyten würde zu geringen Einschränkungen führen und ist mit einer geringen Donormorbidität verbunden. Tenozyten sind schwer zu kultivieren und verlieren in vitro schnell an Fähigkeit EZM zu produzieren (44).

Eine weitere verwendete Zellart sind Adulte Mesenchymale Stammzellen (MSC) (45). Diese sind zwar pluripotent, müssen aber aufwendig aus dem Knochenmark über das Blut oder als Knochenmarkpunktion gewonnen werden und stehen dann nur in sehr geringer Anzahl zur Verfügung (46).

In letzter Zeit erfreute sich die Verwendung von Adipo derived stem cells (ADSC) immer größerer Beliebtheit (47, 48). Ein großer Vorteil ist die einfache Gewinnung von Fettzellen ohne relevante Begleitmorbidität. ADSC sind in großem Maße vorhanden und einfach sowie sicher und minimal-invasiv zu gewinnen.

Aufgrund der Tatsache, dass Tenozyten spezielle Fibroblasten sind (38), liegt es auf der Hand im TTE auf Fibroblasten zurückzugreifen. Dermale Fibroblasten sind sehr einfach in großer Zahl aus der Haut zu gewinnen. Eine weitreichende Differenzierung ist im Gegensatz zu Stammzellen nicht notwendig. Leider scheint die Qualität der Fibroblasten mit dem Alter abzunehmen und die Fähigkeit von jungen Fibroblasten zur Reparatur und Bildung von Kollagen Typ I ist größer (49). Es konnte in vitro gezeigt werden, dass humane dermale Fibroblasten geeignet sind sich unter statischem mechanischem Zug auf einer Polyglykolsäure zu Neo-Sehnen entwickeln und dass sich

humane dermale Fibroblasten nicht von der Kontrollgruppe der humanen Tenozyten unterscheiden. Daraus wurde gefolgert, dass humane dermale Fibroblasten die Tenozyten im TTE ersetzen könnten (50). Die zahlreichen Vorteile humaner dermaler Fibroblasten haben zum Entschluss unserer Arbeitsgruppe geführt, diese zu verwenden.

1.5.2. Mechanische Stimulation im TTE

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist neben der Auswahl der Zellart im TTE die richtige Stimulation der ausgewählten Zellen. Aufgrund der Tatsache, dass die Sehnen in vivo ständig Zug und Entlastung ausgesetzt sind, wird versucht dies im TTE in vitro mechanisch in Bioreaktoren zu simulieren. Dazu sind bereits einige Studien mit unterschiedlichen Zellträgern und verschiedenen Arten von mechanischer Stimulation durchgeführt worden. So stieg der Durchmesser der Kollagen Fibrillen und die Zugkraft unter statischer Belastung bei humanen dermalen Fibroblasten auf Netzen über 14 Wochen an (50). Mesenchymale Stammzellen wurden über azellularisierte humane Umbilikalvenen gegeben und zyklischem Zug über 14 Tage in vitro ausgesetzt. Dazu wurden die Venen in ein Kollagengel eingelegt. Mikroskopisch zeigten sich Tenozyten. Das Konstrukt gewann erheblich an Zugfestigkeit und Steifheit (51). In einer anderen Studie wurde Pferden Sehnengewebe entnommen, dies azellularisiert und in vitro mit mesenchymalen Stammzellen unter zyklischem Zug im Bioreaktor stimuliert. Es zeigte sich, dass bei einer Dehnung von 3%, einer Frequenz von 0,33Hz und dies bei einer Stunde täglich, die mesenchymalen Stammzellen Scleraxis und Kollagen Typ I exprimieren, wie für Tenozyten typisch. Scleraxis ist ein sehr wichtiger Transkriptionsfaktor für die Ausbildung der Helix der Sehne (52). Ebenso steigerte sich die Elastizität und die Zugfestigkeit des besiedelten Gewebes (53). Trotz des großen Aufwands und der hohen Kosten dieser Studien, scheint es aktuell, als sei mechanische Belastung durch Zug ein erfolgversprechender Ansatz im TTE.

1.5.3. Wachstumsfaktoren im TTE

Wachstumsfaktoren beeinflussen nicht nur die Häufigkeit der Zellteilungen. Sie sind auch entscheidend bei der Heilung von Sehnendefekten und der Entwicklung von Sehnen (23). Dabei nehmen sie Einfluss auf die Synthese der EZM und auf die Differenzierung der Zellen. Costa et al. (54) konnte an Flexor digitorum profundus Tenozyten von Hasen zeigen, dass eine Kombination von recombinant human insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in der Zielkonzentration 100ng/ml, recombinant human

platelet-derived growth factor BB, CF (PDGF-BB) in der Zielkonzentration 50ng/ml und recombinant human fibroblast growth factor basic (146 aa) (FGF) in der Zielkonzentration 5ng/ml optimal ist für eine schnellere Tenozytenproliferation. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass diese Wachstumsfaktoren ebenso zu einer gesteigerten Produktion der EZM führen.

Es konnte im Tiermodell nach Durchtrennung der Achillessehne für PDGF-BB gezeigt werden, dass es bei Achillessehnennähten die Zugfestigkeit nach Heilung erhöht (55). Im mehreren weiteren Studien konnten positive Einflüsse von PDGF-BB und IGF-1 (56), beziehungsweise von stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α), PDGF-BB, IGF-1, FGF und growth/differentiation factor 5 (GDF-5) auf die Tenogenese und die Produktion von sehnentypsicher EZM beobachtet werden (56).

Für BMP-13 (bone morphogenetic protein 13 auch bekannt als growth/differentiation factor (GDF) 6) konnte gezeigt werden, dass es die Zellproliferation und die Kollagenproduktion in humanen Patella Sehnen Fibroblasten anregt (57). In der Studie von Wong et al. (57) wurde mit einer Konzentration 10ng/ml gearbeitet. Im Rattenmodell wurde mehrfach für BMP-13 als direkte Injektion des Wachstumsfaktors oder als Adenovirus zur Bildung von BMP-13 bewiesen, dass es die Bildung von Sehnen anregt (58, 59).

In der Sehnenproduktion im TTE und Sehnenheilung in vivo spielen zahlreiche verschiedene Wachstumsfaktoren eine Rolle. Unterschiedlichste Studien wurden bisher unter anderem mit FGF, IGF-1, BMP-2/7/12/13, PDGF-BB, VEGF, TGF- β 1-3 durchgeführt (23).

Nachteile der Wachstumsfaktoren sind die noch relativ hohen Kosten der rekombinant hergestellten Produkte und es muss ebenso das Risiko einer unkontrollierten Zellproliferationsinduktion und der damit verbundenen Kanzerogenese in vivo beachtet werden (60).

1.6. Fragestellung

Bisher konnte sich noch keine Zellart im TTE durchsetzen. Die unterschiedlichen Zellarten verfügen alle über Vor- und Nachteile, wie oben bereits ausgeführt. Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob humane dermale Fibroblasten geeignet sind für das TTE. Kaninchen-Tenozyten, welche als differenzierte Fibroblasten gelten, konnten in vitro mit IGF-1, PDGF-BB und FGF zu einer vermehrten Zellproliferation und Produktion von sehnentypischer EZM gebracht werden (54).

Die Übertragbarkeit von tierischen Ergebnissen auf humane Zellen ist nicht selten komplex. Nichts desto trotz ist es hochinteressant, wie sich humane Zellen nach Stimulation durch die entsprechenden humanen Wachstumsfaktoren verhalten. Als humane Zellart schienen dermale Fibroblasten als Vorläuferzellen von Tenozyten sehr naheliegend, da diese schnell, einfach und in großer Zahl verfügbar sind und das ohne relevante Donormorbidität, was sie für die in-vitro Produktion von Sehnen und dem Ziel der Replantation des produzierten Gewebes in den menschlichen Organismus sehr attraktiv erscheinen lässt.

Die Wirkung dieser Wachstumsfaktoren auf humane Fibroblasten wurde bis dato noch nicht erforscht. Besonders spannend war die Frage ob diese Wachstumsfaktoren zu einer vermehrten Zellproliferation und einer Expression von Sehnenproteinen führen. Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Bedeutung von BMP-13, das schon in vielen Studien, insbesondere an humanen Fibroblasten (57), einen positiven Einfluss auf die Tenogenese zeigte. Hier stellte sich die Frage, ob dieses zu einer zusätzlichen Proliferation oder Produktion von sehnentypischer EZM führt.

Ziel der Arbeit war es zu zeigen, dass humane dermale Fibroblasten durch die Stimulation mit IGF-1, PDGF-BB, FGF und BMP-13 schneller proliferieren und sich in Richtung Tenozyten differenzieren. Dadurch könnte nachgewiesen werden, dass sich diese Zellart für das TTE eignet und diese Wachstumsfaktoren das Zellwachstum beschleunigen, um schneller mehr Zellen zu erreichen. Zusätzlich sollte durch die Stimulation einer Dedifferenzierung der Zellen in Zellkultur entgegen gewirkt werden.

2. Material und Methodik

2.1. Methoden

2.1.1. Zellkultur

2.1.1.1. Zellflaschen und Material

Als Flaschen für die Zellkultur wurden große, sterile Zellkulturflaschen Nunc Flasks Nunclon™Δ mit Filter Cap mit 175cm² Kulturfläche verwendet. Die Arbeit mit der Zellkultur erfolgte mit einem Pipetto mit Glaspipettenspitzen unterschiedlicher Größe sowie bei niedrigeren Volumina mit Pipetten der Firma Gilson mit sterilen Pipettenspitzen.

Des Weiteren wurden sterile und RNA/DNAase freie 50ml Falcons (Blue Max der Firma Beckon Dickinson Labware) und 15ml Zentrifugenröhrchen der Firma TPP verwendet.

2.1.1.2. CO₂ Inkubator

Es wurde für alle Versuche das Gerät der Firma BINDER CB 150 Serial No. 06-03890 benutzt. Die Zellen wuchsen bei 37°C Temperatur, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit über 95%.

2.1.1.3. Medium und Mediumwechsel

Das eingesetzte Medium war Fibroblastenmedium. Dies bestand aus Dulbecco's MEM 500ml von Biochrom AG, FCS 10% 50ml und Penicillin Streptomycin 50IU/ml 3ml. Der Wechsel des Mediums geschah in der Aufzucht der Zellen alle 2-3Tage. Während der 10tägigen Versuchsreihen kam es jeweils an Tag 3 und an Tag 7 zum Mediumwechsel. Das Medium wurde im Wasserbad angewärmt. Das alte Medium wurde abpipettiert und in die Zellkulturflaschen 23ml an frischem Medium gegeben. Die Flaschen befanden sich während der Versuche in CO₂ Inkubator.

2.1.1.4. Ablösen und Waschen von Zellen

Für das Zählen und das Aussähen der Zellen müssen diese in ihrer Zellkulturflasche, wo sie sich an die Oberfläche geheftet haben, abgelöst und gewaschen werden. Zunächst wurde der Überstand abpipettiert. Danach wurden die verblieben Reste des Mediums in der Flasche mit 15ml phosphate buffered saline [PBS(1:10 mit aqua dest. verdünntes

PBS – Dulbecco (10x) w/o Ca^{2+} und Mg^{2+} der Firma Biochrom AG, Berlin)] abgewaschen, die Flasche geschwenkt und die Flüssigkeit verworfen.

Darauf wurden 5ml Trypsin mit EDTA für 5min hinzugegeben, dessen Wirkung durch die Zugabe von 10ml Fibroblastenmedium beendet wurde. Das Gemisch aus Flüssigkeit und Zellen wurde abpipettiert und in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt. Es folgte das Zentrifugieren bei 1500 Umdrehungen für 5min. Der Überstand wird verworfen. Danach wurden die Zellen mit 5ml Medium resuspendiert und konnten gezählt werden.

2.1.1.5. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Ursprünglich wurden die Zellen eingefroren geliefert in unser Labor. Im Verlauf wurden sie aufgetaut und vermehrt. Damit sich die Zellen in einer möglichst niedrigen Passage befinden, wurden stets Zellen eingefroren zur späteren Verwendung. Nachdem die Zellen abgelöst, gewaschen, gezählt, zentrifugiert wurden und der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellpellett mit Einfriermedium resuspendiert, so dass 1,5 Millionen Zellen mit 1,5ml Einfriermedium (70% Zellkulturmedium, 20% FCS und 10% DMSO) in 1 Kryoröhrchen gegeben wurden. Danach kamen die Zellen in Einfrierboxen im Gefrierschrank bei -80°C .

Zum Auftauen wurden 15ml Medium in ein Falcon gegeben. Das Kryoröhrchen wurde aus dem -80°C Schrank entnommen und im Wasserbad aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eiswürfel zu sehen war. Daraufhin wurde der Inhalt in den Falcon gekippt. Dieses Gefäß wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellett resuspendiert und in Zellflaschen gegeben.

2.1.2. Optische Methoden

2.1.2.1. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer improved Zählkammer ermittelt. Nach dem Ablösen und Waschen der Zellen kann man diese zählen. Dazu wurden 10 μl Zellsuspension mit 10 μl Trypanblau Lösung in einem Erlenmeyer Kolben gut gemischt. Danach wurde das Deckglas angefeuchtet und mittig auf die Zählkammer platziert. Die Zählkammer wurde danach mit einer Pipette befüllt. Es folgte die Auszählung der Zellen unter dem Lichtmikroskop. Dabei wurden die vier Quadranten (oben links, oben rechts, unten links und unten rechts) ausgezählt. Die Gesamtzahl durch 2 dividiert und mit 10^4 multipliziert ergibt die Konzentration Zellen pro ml. Diese multipliziert man mit dem Volumen in ml in dem Falcon und erhält so die Zellzahl.

2.1.2.2. Fotografie

Die Fotos wurden durch das Mikroskop Zeiss Axiovert 40 CFL mit der Kamera Canon A650 IS B52 Wide durch das Soligor Adapter Tube geschossen. Es kamen die Vergrößerungen 5-, 10-, 20- und 32fach zum Einsatz. Dazu wurden die Zellen in den Zellflaschen fotografiert.

2.1.3. Stimulation mit Wachstumsfaktoren

2.1.3.1. IGF-1

Als einer der stärksten Wachstumsfaktoren ist IGF-1 bekannt (61). Dieser wirkt über einen membranständigen Insulinrezeptor der Zelle und kann auch kanzerogen sein (62). Es wurde recombinant human insulin-like growth factor 1 (IGF-1) der Firma R&D Systems Cat. Nr. 291-G1, Lot: ON S201 1021 verwendet. Dieser wurde auf die Zielkonzentration 100ng/ml in den Zellkulturflaschen sowie im WST-1 Versuch verdünnt.

2.1.3.2. PDGF-BB

Zur besseren Heilung wird PDGF-BB hauptsächlich von Thrombozyten bei Gefäßverletzungen ausgeschüttet und jedoch aber auch von glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Makrophagen produziert (63). Insbesondere eine steigernde Wirkung auf die Mitose ist über diesen Wachstumsfaktor bekannt (64). Man verwendete recombinant human platelet-derived growth factor BB, CF (PDGF-BB) Cat. Nr. 220-BB Lot: BW 2010072 der Firma R&D Systems. Es erfolgte eine Verdünnung auf die Zielkonzentration 50ng/ml in den Zellkulturflaschen und im WST-1 Versuch.

2.1.3.3. FGF

Ein weiteres Protein, das die Mitose und Angiogenese fördert sowie positive Eigenschaften auf die Sehnenheilung hat ist FGF (65). Es wurde recombinant human fibroblast growth factor basic (146 aa) (FGF) Cat. Nr. 233-FB-025 der Firma R&D Systems verwendet. Die Zielkonzentration lag in den Zellkulturflaschen und im WST-1 Versuch bei 5ng/ml. Diese wurde durch Verdünnung erreicht.

2.1.3.4. BMP-13

Für die Blockade der Osteogenese (66) und Förderung der Sehnenbildung eignet sich BMP-13 gut (67). Für die Versuche wurde recombinant human bone morphogenetic

protein 13/ cartilage-derived morphogenetic protein-2 (BMP-13) des Herstellers Peprotech Cat. Nr. 120-04 Lot. 0104272 in der Zielkonzentration 25ng/ml verwendet, die durch Verdünnung erzielt wurde.

2.1.4. WST-1 Test

Zur Bestimmung der Zellproliferation empfiehlt sich der WST-1 Test. Dafür wurden 96er Mikrowell Platten benutzt, wobei in die mit anfangs jeweils 1000 Zellen bestückten Wells 200µl Medium mit den der Versuchsgruppe zugehörigen Wachstumsfaktoren kamen. Daneben wurden in die angrenzenden Wells 200µl destilliertes Wasser gefüllt. Dann wurden sie im CO₂ Inkubator bebrütet. Der Mediumwechsel erfolgte an Tag 3 und an Tag 7. Messtage waren Tag 1, Tag 3, Tag 7 und Tag 10. Am Tag der Messung wurde das Medium aus den Wells abpipettiert und mit jeweils 200µl frischem Medium ersetzt. Zusätzlich wurden jeweils 20µl WST-1 Reagenz der Firma Roche dazugegeben. Dies wurde 5min auf einer Schwenkplatte vermischt. Danach kam die Platte für 2 Stunden wieder zurück in den CO₂ Inkubator. Nachdem die Platte aus dem Schrank wieder entnommen wurde, kam sie für weitere 5min auf die Schwenkplatte für die Vermischung. Daraufhin wurden 100µl aus jedem Well in ein neues Well pipettiert. Vorhandene Luftblasen wurden mit einer sterilen Nadel zerstochen. Schließlich erfolgte die Extinktionsmessung der 96er Mikrowell Platte in einem Microplate- ELISA-Reader bei 450nm. Ausgewertet wurden die Ergebnisse anhand der Extinktionsdifferenz zwischen den Wells mit Zellen und dem Extinktionsleerwert.

2.1.5. Analyse der Genexpression

2.1.5.1. Gewinnung von RNA

Aus den Zellen musste RNA gewonnen werden, um die Genexpression zu messen. Dies geschah mit dem RNase-Free DNase Set der Firma Qiagen. Nach dem Zählen der Zellen, wurden 5×10^5 Zellen mit Medium in einen Falcon gebracht. Daraufhin wurde das Medium mit 1500 Umdrehungen für 5min abzentrifugiert. Der Überstand oberhalb der Zellschicht wurde abpipettiert. RLT-Puffer wurde hergestellt, indem 10ml RLT zu 100µl beta-Mercaptoethanol gegeben wurden. Zu den Zellen werden 350µl RLT-Puffer hinzugefügt. Durch auf- und abpipettieren entsteht ein homogenes Zelllysate. Dieses wurde in ein steriles 1,5ml Eppendorf gegeben. Diese Zelllysate können bei -80°C eingefroren und gelagert werden.

Zu dem Zelllysat wurde im Verhältnis 1:1 70% Ethanol hinzugefügt, in diesem Fall 350µl. 700µl des Lysat/70% Ethanol Gemisches wurden auf die RNeasy Mini-Säule im 2ml Tube pipettiert und 20s bei 10000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

Anschließend wurden 350µl RW1-Puffer auf die Minisäule gegeben, bei 10000rpm für 20s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wird wiederholt.

Dann wurden 500µl RPE-Puffer auf die Minisäule gegeben, bei 10000rpm für 20s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Es wurden daraufhin nochmal 500µl RPE-Puffer auf die Minisäule gegeben und zum Trocknen der Silicalgelmembran bei 10000rpm für 2min zentrifugiert.

Die Minisäule wurde in ein 1,5ml Tube überführt. Danach wurden 30µl RNase freies Wasser auf die Membran pipettiert und die RNA wurde bei 10000rpm über 2min von der Membran gelöst. Dann wurde die RNA auf Eis gelagert. Es wurde eine 1:25 Verdünnung hergestellt aus 4µl Probe und 96µl RNase freiem Wasser, um die Konzentration der RNA im Photometer Gene Quant II der Firma Pharmacia Biotech zu messen. Die RNA konnte bei -80°C eingefroren werden.

2.1.5.2. Umschreiben in cDNA

Nachdem die mRNA isoliert wurde, musste sie in die stabilere cDNA umgeschrieben werden für die spätere Analyse. Dies erfolgte mit dem Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit. Zunächst wurden die Reagenzien und Proben auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden sie kurz zentrifugiert mit einer Tischzentrifuge. Die RNA wurde so mit RNase free Water verdünnt, dass genau 1µg RNA in 12µl Lösung enthalten sind. Danach wurden 2µl gDNA Wipeout Buffer 7x hinzugegeben. Die Proben wurden dann in den Bio-Rad Thermocycler DNAEngine gegeben. Es wurde zunächst für 2 Minuten bei 42°C inkubiert.

Nach dem die Proben aus dem Thermocycler entnommen werden konnte, wurden jeweils 6µl Mastermix hinzugefügt.

Der Mastermix bestand aus pro Probe jeweils:

Quantiscript Reverse Transcriptase	1µl
Quantiscript RT Buffer 5x	4µl
RT Primer Mix	1µl

Anschließend kamen die Proben erneut in den Thermocycler. Sie wurden für 15 Minuten inkubiert und danach 3 Minuten auf 95°C erhitzt um die Reverse Transkriptase zu deaktivieren.

Daraufhin war die cDNA fertig gestellt und konnte entweder direkt für eine Real-Time PCR benutzt oder bei -20°C eingefroren werden.

2.1.5.3. Light Cycler

Die Versuche zur quantitativen cDNA-Messung erfolgten mit dem Light Cycler 2.0 der Firma Roche. Zunächst wurde ein Mastermix vorbereitet. Dieser bestand aus 15µl PCR-grade H₂O, 2µl Primer Gemisch aus 10µM forward und 10µM reverse und 2µl SybrGreen pro Probe. Es wurden 19µl Mastermix in ein steriles 1,5ml Eppendorf pipettiert und dazu 1µl der cDNA Probe. Danach wurde das Eppendorf gevortext und bei 5000rpm für 30s zentrifugiert. Anschließend wurde der Inhalt in die Light Cycler Kapillaren pipettiert und diese mit Deckel verschlossen. Daraufhin wurden diese bei 2000rpm für 30s zentrifugiert. Nach der Entnahme aus der Zentrifuge konnten die Proben in den Rotor gestellt werden. Es erfolgten jeweils Doppelwertbestimmungen sowie ein Vergleich zu einer Probe PCR-grade H₂O. Es wurde das Programm LightCycler3 Front Screen gestartet. Darin wurde der entsprechende Light Cycler Lauf für den verwendeten Primer ausgewählt und gestartet.

Für GAPDH und EF1A wurde folgender Zyklus gefahren:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	10min	95°C	1
Amplifikation	30s	94°C	45
	30s	60°C	
	30s	72°C	
Schmelzkurve	10min	58-95°C (0,1°C/s)	1
Abkühlen	30s	40°C	
Ende			

Für Collagen 1, Collagen 3, Osteocalcin, Tenascin C und Decorin wurde folgender Zyklus gefahren:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	10min	95°C	1
Amplifikation	30s	94°C	45
	30s	64°C	
	30s	72°C	
Schmelzkurve	10min	58-95°C (0,1°C/s)	1
Abkühlen	30s	40°C	
Ende			

Für Kollagen Typ II wurde folgender Zyklus gefahren:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	10min	95°C	1
Amplifikation	30s	94°C	45
	30s	66°C	
	30s	72°C	
Schmelzkurve	10min	58-95°C (0,1°C/s)	1
Abkühlen	30s	40°C	
Ende			

2.1.5.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die cDNA wurde auch für die RT-PCR benutzt. Es wurden die Proteine GAPDH, Tenomodulin und Scleraxis analysiert. Der Mix wurde folgendermaßen in die PCR-Tubes zusammengesetzt:

cDNA	2µl (GAPDH 1µl)
10x TaqPuffer	2µl
MgCl ₂ 25mM	1µl
Primer a 10pM	0,5µl
Primer b 10pM	0,5µl
dNTP's 25mM	0,2µl
H ₂ O	13,7µl (GAPDH 14,7µl)
Taq-Polymerase	0,1µl

Dann wurden die PCR-Tubes in den Thermocycler gegeben. Zur Amplifikation wurde folgendes Programm benutzt:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	3min	95°C	1
Amplifikation	30s	95°C	40
	30s	60°C	
	30s	72°C	
Endpolymerisation	10min	72°C	1
Ende		4°C	

Bei Tenomodulin erfolgte der mittlere Amplifikationsschritt bei 64°C.

2.1.5.5. Agarose-Gelelektrophorese

Nach der PCR erfolgte eine Gelelektrophorese in der Elektrophoreseeinheit Whatman Horizon 11.14. Die Kammer wurde mit den Gelgießsperrern und einem Kamm mit 20 Fächern bestückt. Zuerst musste das Agarose Gel hergestellt werden. Dazu wurden 2g Agarose in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Dazu wurden 100ml 1xTAE-Puffer und ein Rührfisch gegeben, welche mit einem Magnetrührer vermischt wurden. Der Rührfisch wurde anschließend entfernt. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle 3 Mal mit 600W aufgeköcht, damit die Agarose aufgelöst war. Dann kühlte das Gemisch etwas ab, bevor 2µl Ethidiumbromid hinzugegeben wurden, welches wieder auf dem Magnetrührer vermischt wurde. Anschließend wurde das Gel ohne Rührfisch in die vorbereitete Kammer gegossen. Vereinzelte Luftblasen wurden mit einer sterilen Nadelspitze entfernt. Nachdem das Gel 20min ausgehärtet war, wurde der Kamm vorsichtig gezogen. Daraufhin wurde die Kammer mit 1000ml 1x TAE-Puffer, der mit 10µl Ethidiumbromid versetzt war, gefüllt. Den cDNA Proben wurden jeweils 10µl entnommen und diese 10µl Probe wurde mit 2µl Loading Puffer vermischt. In die erste Geltasche kam 5µl DNA-Größenstandard (DNA-Ladder). Die weiteren Geltaschen wurden mit jeweils 5µl der vermischten Proben befüllt. Danach konnte die Elektrophorese gestartet werden. Diese erfolgt über 120min bei 80V und 102mA. Die Auswertung erfolgt am Bio-Rad Fluor S MultiImager mit dem Programm Quantity One.

2.2. Material

Es kamen folgende Geräte und Materialien zum Einsatz (68).

2.2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

CO ₂ Inkubator BINDER CB 150	Binder, Tuttlingen
Gelelektrophorese Whatman Horizon 11.14	Whatman, Dassel
Eppendorf Tubes	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyer Kolben	Schott Duran, Wertheim
Falcon 50ml Blue Max	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Fluor-S MultiImager	Bio-Rad, München
Gefrierschrank Hera freeze -80°C	Heraeus, Hanau
Gefrierschrank Premium No Frost -20°C	Liebherr, Biberach
Handschuhe Semper Latex Powder Free	Sempermed, Neuwied
Kamera Canon A650 IS B52 Wide	Canon, Krefeld
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Light Cycler Kapillaren 20µl	Roche Diagnostic, Mannheim
Light Cycler 2.0	Roche Diagnostic, Mannheim
96-Microwell Platten	Nunc, Roskilde, Dänemark
Mikroskop Zeiss Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen
Nadel Microlance 3	Becton Dickinson Labware,, Heidelberg
Photometer Gene Quant II Pharmacia Biotech	General Electric Life Sciences, Freiburg
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Pipetten (Glas) Cellstar	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Gilson, Middleton, USA
Pipetto Accu Jet Pro	Brand, Wertheim
RNase freie Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt
Soligor Adapter Tube, for Canon A650 IS B52 Wide	Soligor, Leinfelden-Echterdingen
Sterilbank Lamin Air HB 2448	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Sky Line	ELMI, Riga, Lettland
Thermocycler DNAEngine	Bio-Rad, München

Waage Sartorius
Wasserbad Julabo TW 20
Zählkammer Neubauer improved

Zellkulturflaschen Nunclon™Δ 175cm²
Zentrifuge Centrifuge 5417 R
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1 L-R
Zentrifugenröhrchen 15ml

Sartorius, Göttingen
Julabo, Seelbach
Karl Hecht Assistnet, Altnau,
Schweiz
Nunc, Roskilde, Dänemark
Eppendorf, Hamburg
Heraeus, Hanau
TPP, Trasadingen, Schweiz

2.2.2. Chemikalien und Reagenzien

Agarose Electrophoresis Grade
Bacillol AF
DNA Loading Dye 6x
DNA Ladder GeneRuler 100bp
dNTPs
Ethanol 70%

Ethidium Bromide 10mg/dl
Fetales Kälberserum (FCS)

Gigasept AF
Light Cycler FastStart Essential,
DNA Green Master
Light Cycler FastStart DNA Master Plus,
Syber Green
Medium Dulbecco's MEM 500ml
beta-Mercaptoethanol
PBS (phosphate buffered saline) Dulbecco
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml
Qiazol Lysis Reagent
QuantiTect Reverse Transcription Kit
RNeasy Mini Kit
RNase Free DNase Set
RNase Zap

Invitrogen, Carlsbad, USA
Bode, Hamburg
Fermentas, St. Leon-Rot
Fermentas, St. Leon-Rot
Fermentas, St. Leon-Rot
Apotheke Universität München
Innenstadt
Bio-Rad, München
PAA Laboratories, Pasching,
Österreich
Schülke&Mayr, Norderstedt
Roche Diagnostic, Mannheim

Roche Diagnostic, Mannheim

Biochrom, Berlin
Sigma-Aldrich, Steinheim
Biochrom, Berlin
Biochrom, Berlin
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Ambion Life Technologies,

TAE Puffer (10x)	Carlsbad, USA
Taq Polymerase mit Puffern	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypanblau 0,4%	Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin/EDTA (10x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Wasser Aqua ad iniectabilia	Biochrom, Berlin
WST-1 Reagenz	B. Braun, Melsungen
Zellproliferationsreagenz WST1	Roche Diagnostic, Mannheim
	Roche Diagnostic, Mannheim

2.2.3. Zellen – Fibroblasten

Die dermalen Fibroblasten wurden im Jahr 2000 vom Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie von der Provitro GmbH aus Berlin in Passage 2 gekauft. Sie stammten von einer 26jährigen weiblichen Spenderin der kaukasischen Ethnie und wurden am 04.08.1999 isoliert. Sie sind HIV, Hepatitis B und C negativ.

2.2.4. Primer

Humanes Gen	Primersequenz 5' --> 3'
1. GAPDH forward GAPDH reverse	TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG
2. Collagen 1 forward Collagen 1 reverse	TGA CCT CAA GAT GTG CCA CT ACC AGA CAT GCC TCT TGT CC
3. Collagen 2 forward Collagen 2 reverse	CGC ACC TGC AGA GAC CTG AA TCT TCT TGG GAA CGT TTG CTG G
4. Collagen 3 forward Collagen 3 reverse	GCT GGC ATC AAA GGA CAT CG TGT TAC CTC GAG GCC CTG GT
5. Osteocalcin forward Osteocalcin reverse	CCC AGG CGC TAC CTG TAT CAA CTG GAG AGG AGC AGA ACT GG
6. Tenascin C forward Tenascin C reverse	TTC ACT GGA GCT GAC TGT GG TAG GGC AGC TCA TGT CAC TG
7. Decorin forward Decorin reverse	CGC CTC ATC TGA GGG AGC TT TAC TGG ACC GGG TTG CTG AA
8. Tenomodulin forward Tenomodulin reverse	CCA TGC TGG ATG AGA GAG GT CTC GTC CTC CTT GGT AGC AG
9. Scleraxis forward (fwd) Scleraxis reverse (rev)	CTG GCC TCC AGC TAC ATC TC CGG TCC TTG CTC AAC TTT CT
10. Elongationsfactor 1 A fwd EF 1A rev (69)	AGC GCC GGC TAT GCC CCT G CTG AAC CAT CCA GGC CAA AT

2.2.5. Computerprogramme und Software

Es wurden folgende Programme verwendet:

LightCycler3 Front Screen

Microsoft Excel 2010

Microsoft Word 2010

Quantity One bei FluorS-Imager

SPSS 20

3. Statistische Methoden

Mit Hilfe von Excel und SPSS wurde jeweils zwischen den Gruppen mit und ohne Wachstumsfaktoren ein nicht gepaarter, zweiseitiger T-Test durchgeführt. Bei der Zellzahl, Extinktion im WST-Test und den Ratios der C_t -Werte kommt es zu normalverteilten Werten. Deswegen ist der T-test statistisch der richtige Test als parametrischer Test, wenn zwei Gruppen miteinander verglichen werden.

Die relative Genexpression der C_t -Werte wurde mit der Delta/Delta Methode errechnet (70) und als Ratios zur Genexpression von EF1A (Referenzgen) dargestellt. Die Formel hierfür lautet:

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Versuchsgruppe} - \Delta C_t \text{ Kontrollen}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Versuchsaufbau

Es erfolgte eine Einteilung in 2 Gruppen. Gruppe 1 (G1) wurde mit einem Mix aus Wachstumsfaktoren stimuliert, der durch Costa et al. im Tiermodell bereits erfolgreich getestet wurde (54). Dieser bestand aus recombinant human insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in der Zielkonzentration 100ng/ml, recombinant human platelet-derived growth factor BB CF (PDGF-BB) in der Zielkonzentration 50ng/ml und recombinant human fibroblast growth factor basic (146 aa) (FGF) in der Zielkonzentration 5ng/ml. Gruppe 2 (G2) erhielt zusätzlich zu den in Gruppe 1 verwendeten Wachstumsfaktoren recombinant human bone morphogenetic protein 13/ cartilage-derived morphogenetic protein-2 (BMP-13) in der Zielkonzentration 25ng/ml. Des Weiteren gab es eine Kontrollgruppe, die nicht mit Wachstumsfaktoren versetzt wurde.

Die Zellkulturflaschen wurden jeweils mit 75.000 Fibroblasten gefüllt und die Wells im WST-1 Versuch wurden jeweils mit 1000 Fibroblasten bestückt. Im 1. Durchlauf wurden Fibroblasten in der 6. Passage, im 2. Durchlauf in der 7. Passage und im 3. Durchlauf in der 9. Passage verwendet.

Der Mediumwechsel mit frischen Wachstumsfaktoren erfolgte am dritten und siebten Tag in den Zellkulturflaschen und 96er Mikrowell Platten. Während der gesamten Zeit konnten sich die Zellen im CO₂ Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit weiter vermehren.

Die Zellzahl wurde jeweils an Tag 3, Tag 7 und Tag 10 bestimmt. Ebenso wurde im WST-1 Versuch die Extinktion an denselben Tagen gemessen. Nach der Zellzahlbestimmung wurde an diesen Tagen die RNA isoliert, um die Differenzierung der Zellen zu bestimmen.

5. Ergebnisse

5.1. Morphologie

5.1.1. Ausgangsstatus

Am Tag 0 in den Abbildungen 8-11 zu Beginn des Versuchs zeigten die Zellen in Zellkultur ein für Fibroblasten typisches lockeres Erscheinungsbild mit wenig Zell-Zell-Kontakten. Sie präsentierten sich ungeordnet mit einer normalen Zellaktivität, auf die die intrazellulären Vesikel schließen.

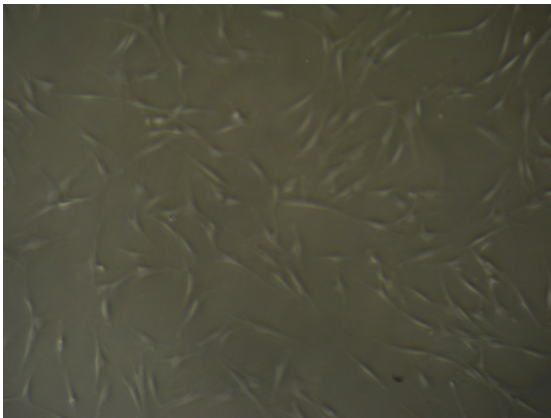


Abbildung 8: Fibroblasten Tag 0 6x5-fache Vergrößerung

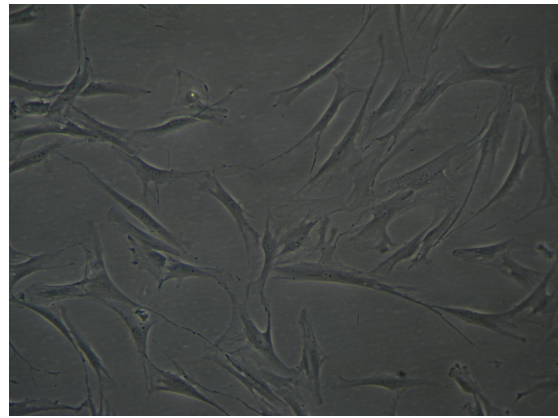


Abbildung 9: Fibroblasten Tag 0 6x10-fache Vergrößerung



Abbildung 10: Fibroblasten Tag 0 6x20-fache Vergrößerung

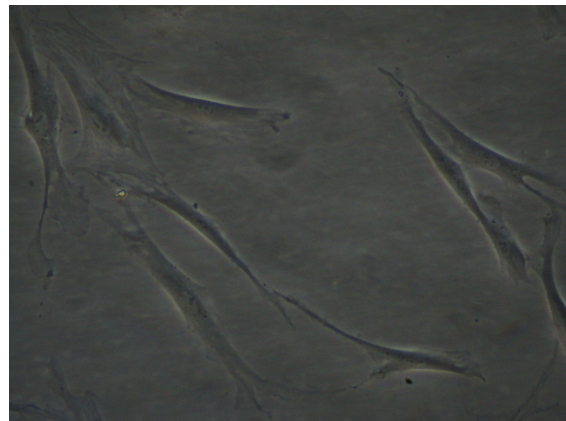


Abbildung 11: Fibroblasten Tag 0 6x32-fache Vergrößerung

5.1.2. Vergleich an Tag 3

Insgesamt zeigen sich im Mikroskop keine Differenzen zwischen den Gruppen an Tag 3 bei den Abbildungen 12-15.

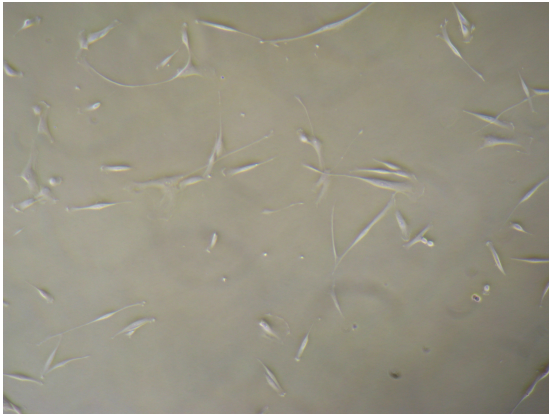


Abbildung 12: Gruppe 1 Tag 3 6x5fache Vergrößerung

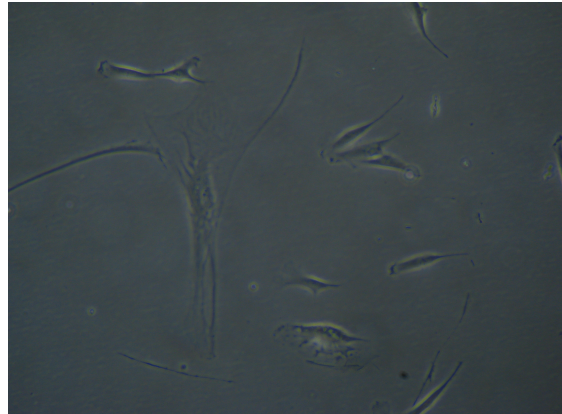


Abbildung 13: Gruppe 2 Tag 3 6x10fache Vergrößerung

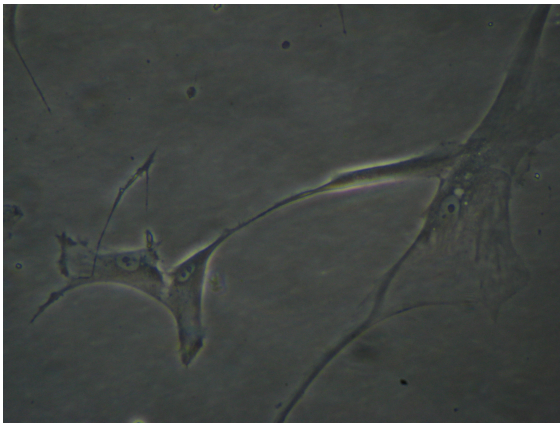


Abbildung 14: Gruppe 1 Tag 3 6x20fache Vergrößerung

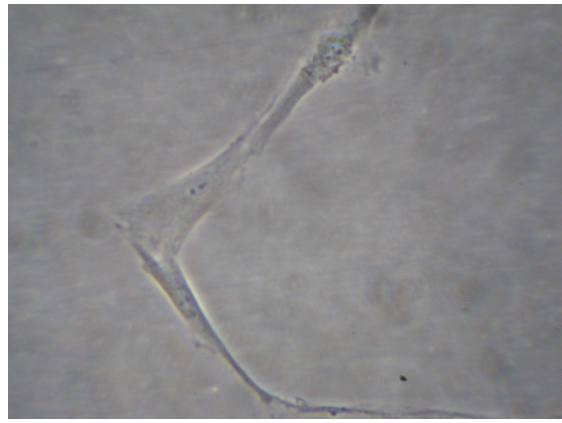


Abbildung 15: Kontrolle Tag 3 6x32fache Vergrößerung

5.1.3. Vergleich an Tag 7

Gruppe 1 und Gruppe 2 zeigen deutlich mehr Zell-Zell-Kontakte in der Übersicht und in der nächsthöheren 6x10fachen Vergrößerung in den Abbildungen 16-21.

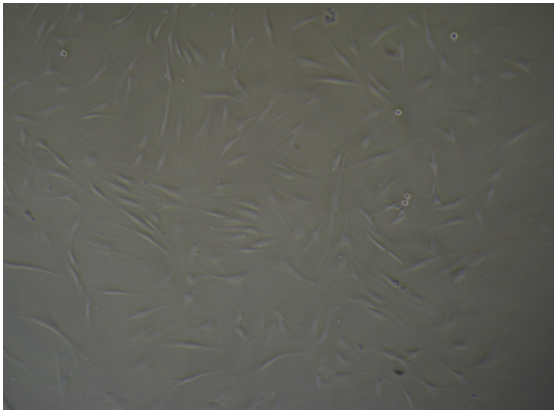


Abbildung 16: Kontrolle Tag 7 6x5fache Vergrößerung kaum Zell-Zell-Kontakte

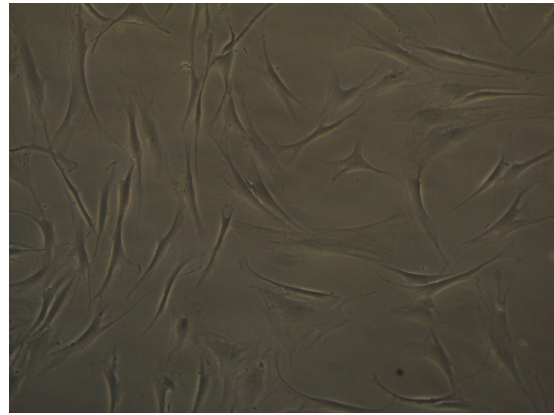


Abbildung 17: Kontrolle Tag 7 6x10fache Vergrößerung

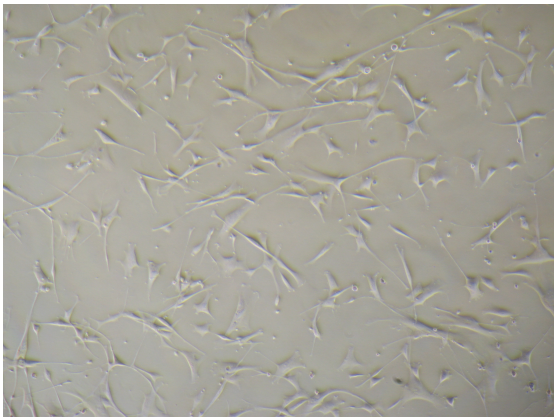


Abbildung 18: Gruppe 1 Tag 7 6x5fache Vergrößerung mit mehr Zell-Zell-Kontakten

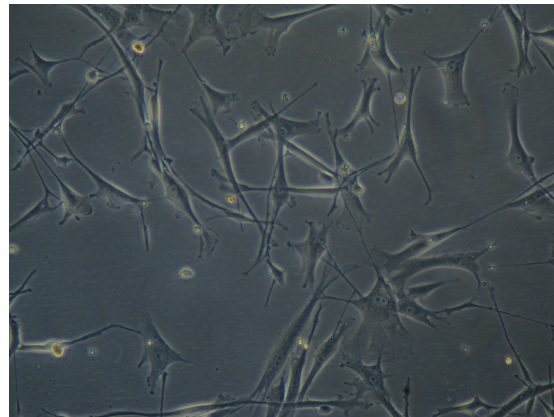


Abbildung 19: Gruppe 1 Tag 7 6x10fache Vergrößerung mit mehr Zell-Zell-Kontakten

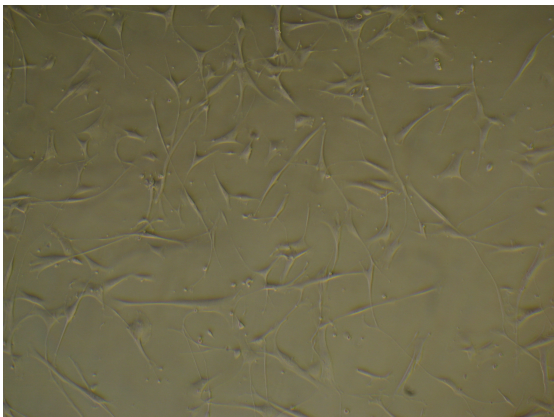


Abbildung 20: Gruppe 2 Tag 7 6x5fache Vergrößerung mit ebenso mehr Zellkontakten

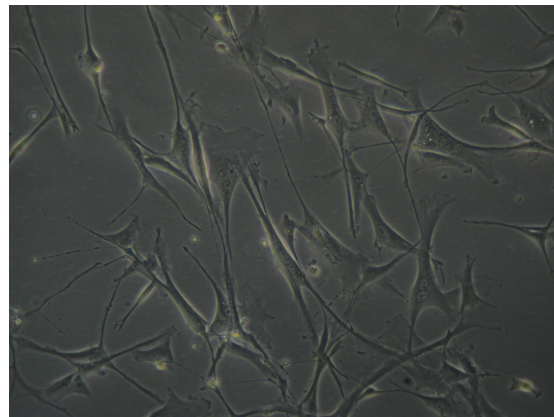


Abbildung 21: Gruppe 2 Tag 7 6x10fache Vergrößerung mit mehr Zell-Zell-Kontakte

In einer weiteren Vergrößerung (Abbildung 22-27) zeigen sich die vermehrten Zell-Zell-Interaktionen von Gruppe 1 und 2 deutlich und erheblich mehr Vesikel um den Zellkern, was auf eine erhöhte Zellaktivität und Proteinproduktion hindeutet. In den detailreicheren Aufnahmen mit der höchsten Auflösung sind in Gruppe 1 und Gruppe 2 erheblich mehr intrazelluläre Vesikel und Zell-Zell-Kontakte zu erkennen als in der Kontrolle, wobei sich diese unverändert zu den niedrigeren Vergrößerungen zeigt.

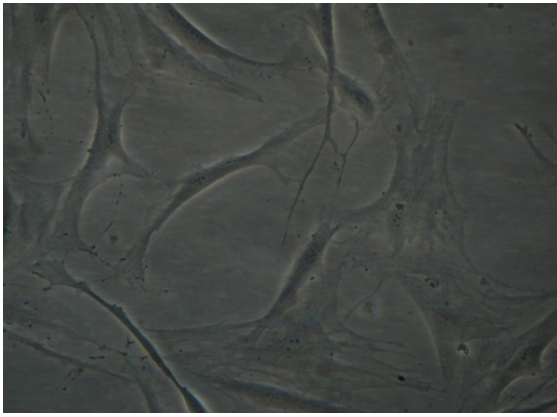


Abbildung 22: Kontrolle Tag 7 6x20fache Vergrößerung

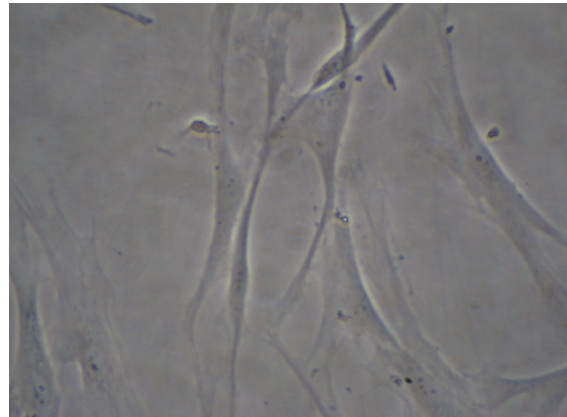


Abbildung 23: Kontrolle Tag 7 6x32fache Vergrößerung

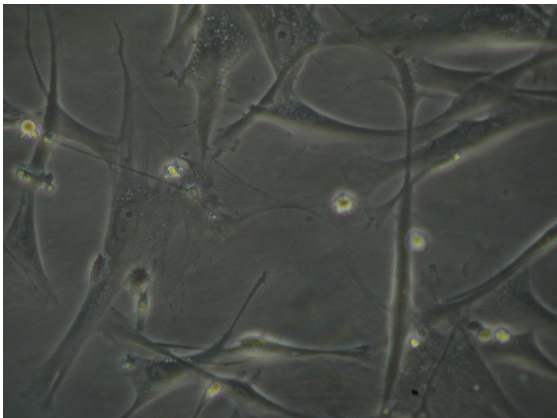


Abbildung 24: Gruppe 1 Tag 7 6x20fache Vergrößerung mehr Zellkontakten und Vesikel als die Kontrolle

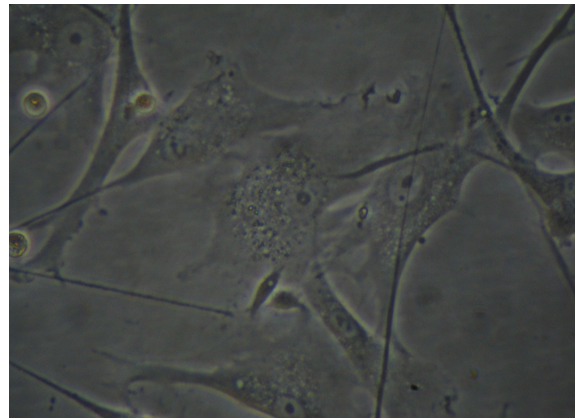


Abbildung 25: Gruppe 1 Tag 7 6x32fache Vergrößerung mit vielen Zellkontakten und intrazellulären Vesikeln

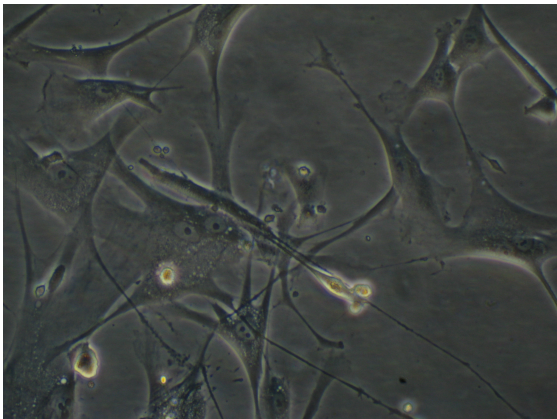


Abbildung 26: Gruppe 2 Tag 7 6x20fache Vergrößerung mehr Zellkontakten und Vesikel als die Kontrolle

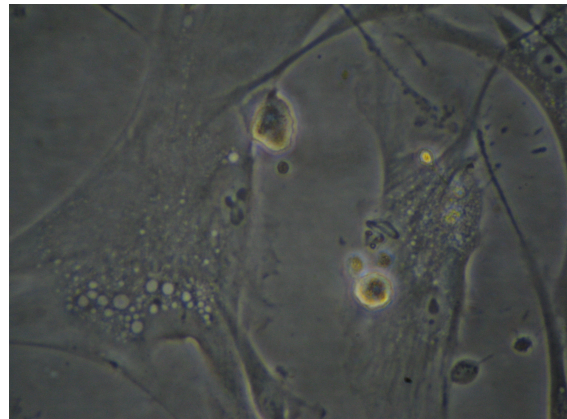


Abbildung 27: Gruppe 2 Tag 7 6x32fache Vergrößerung mit intrazellulären Vesikeln

5.1.4. Vergleich an Tag 10

Das Erscheinungsbild der Fibroblasten unterscheidet sich zwischen den Gruppen in Abbildung 28-33. Die Fibroblasten in Gruppe 1 und 2 wirken langgestreckter und mit mehr Zellkontakten. Hier zeigen sich in der nächsten Vergrößerung wieder mehr Zellverbindungen und intrazelluläre Vesikel in den Gruppen 1 und 2. Die Kontrolle zeigt sich unverändert zu Tag 7.

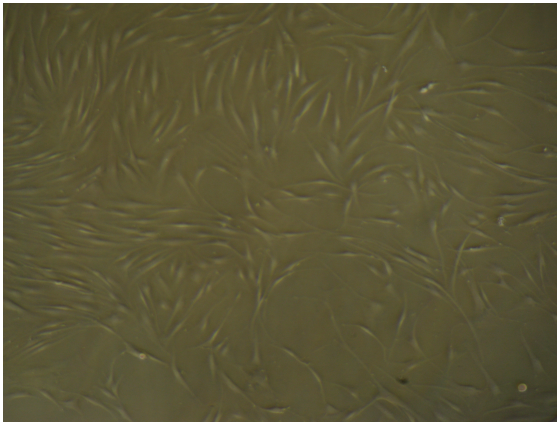


Abbildung 28: Kontrolle Tag 10 6x5fache Vergrößerung wenig Zell-Zell-Kontakte

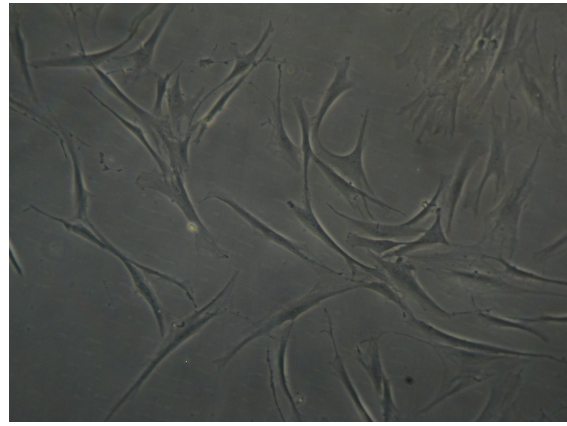


Abbildung 29: Kontrolle Tag 10 6x10fache Vergrößerung

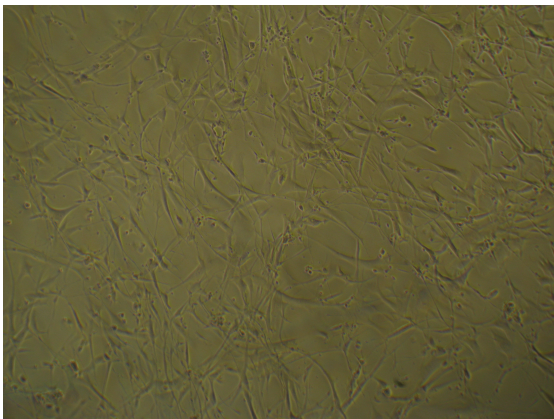


Abbildung 30: Gruppe 1 Tag 10 6x5fache Vergrößerung langgestreckte und vernetzte Zellen

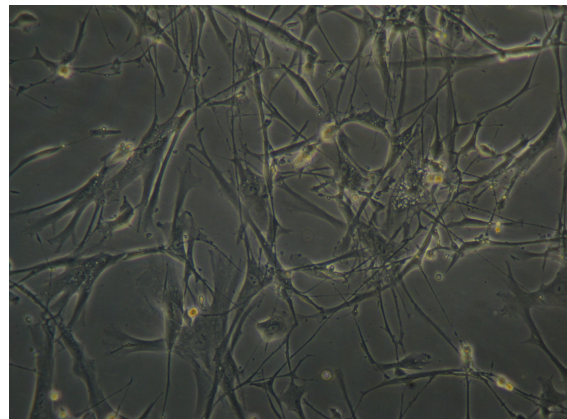


Abbildung 31: Gruppe 1 Tag 10 6x10fache Vergrößerung langgestreckte und vernetzte Zellen mit Zell-Zell-Kontakten und Vesikeln



Abbildung 32: Gruppe 2 Tag 10 6x5fache Vergrößerung zahlreiche Zell-Zell-Kontakte

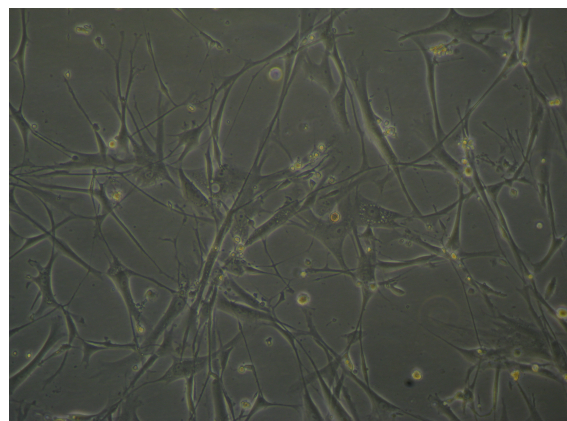


Abbildung 33: Gruppe 2 Tag 10 6x10fache Vergrößerung langgestreckt mit Zell-Zell-Kontakten, wie Gruppe 1, zeigen sich die Zellen

Eine deutlich größere Zahl an Vesikeln und Zellkontakten sowie weiter verzweigte Zellen sind auch hier in den beiden Gruppen mit Wachstumsfaktoren zu beobachten (Abbildungen 34-39). In der Auflösung 6x20 zeigt sich die Kontrolle unverändert zu Tag 7. Ebenso, wie bei den vorangegangenen Aufnahmen, sind bei der stärksten Vergrößerung in den Gruppen 1 und 2 deutlich mehr Zell-Zell-Kontakte vorhanden und es tritt eine deutlich größere Vesikeldichte auf.



Abbildung 34: Kontrolle Tag 10 6x20fache Vergrößerung

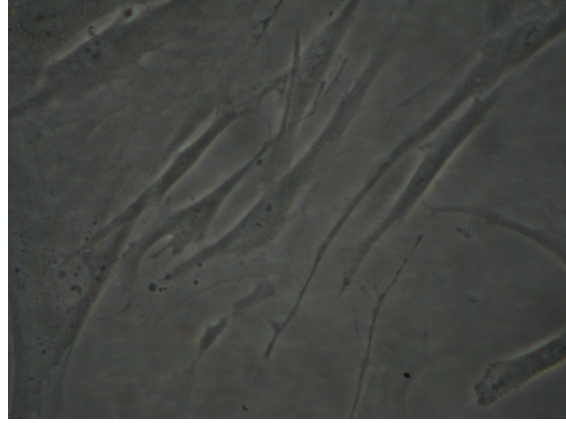


Abbildung 35: Kontrolle Tag 10 6x32fache Vergrößerung kaum Kontakte oder Vesikel

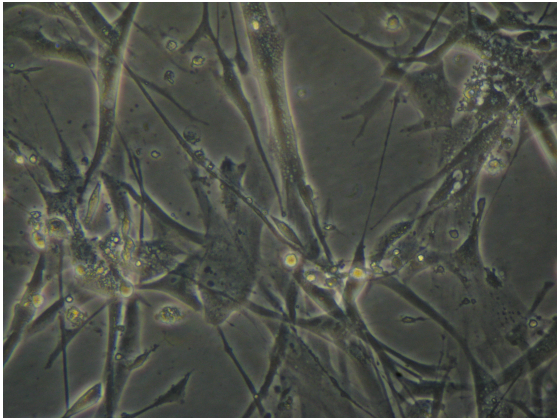


Abbildung 36: Gruppe 1 Tag 10 6x20fache Vergrößerung zahlreiche intrazelluläre Vesikel und Zell-Zellkontakte

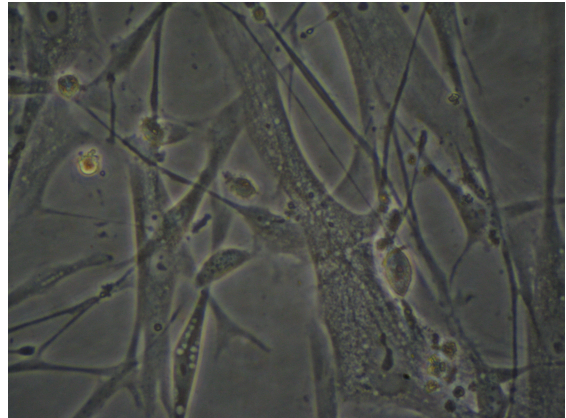


Abbildung 37: Gruppe 1 Tag 10 6x32fache Vergrößerung starke Vernetzung und zahlreiche Vesikel

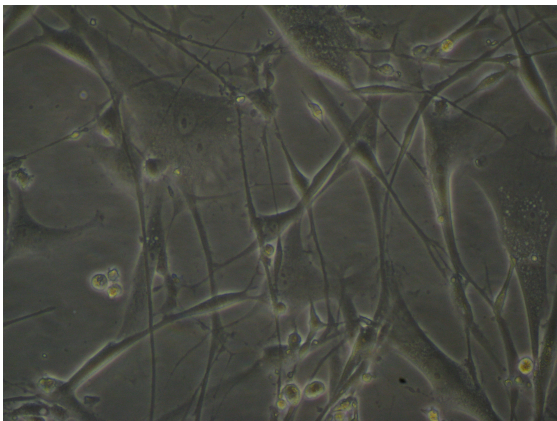


Abbildung 38: Gruppe 2 Tag 10 6x20fache Vergrößerung viele Vesikel und Zellkontakte

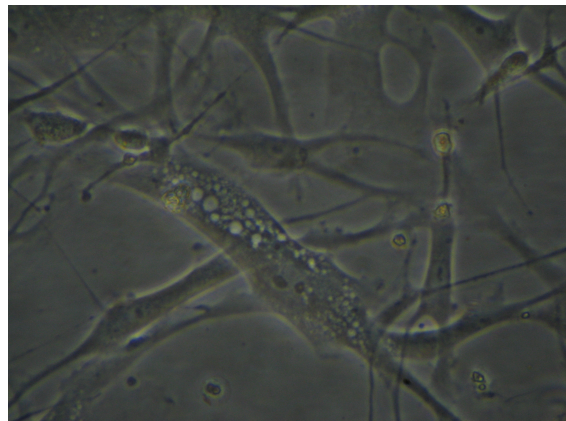


Abbildung 39: Gruppe 2 Tag 10 6x32fache Vergrößerung viele Kontakte und Vesikel

5.1.5. Mediumwechsel

Beim Mediumwechsel konnte man zudem feststellen, dass das Medium von Gruppe 2 zähflüssiger ist, als das der Gruppe 1, welches wiederum eine höhere Viskosität zeigte als die Kontrolle.

5.2. Zellproliferation

5.2.1. Zellzahl

Alle Zellkulturflaschen wurden mit zunächst mit 75.000 Fibroblasten gefüllt. Es wurden an allen Messtagen jeweils die höchsten Zellzahlen in Gruppe 2 festgestellt. Die zweithöchste Anzahl an Zellen wurde stets in Gruppe 1 gemessen. Die Kontrollgruppe ohne Wachstumsfaktoren zeigte im Durchschnitt über den beobachteten Zeitraum die niedrigsten Zellzahlen an allen Messtagen.

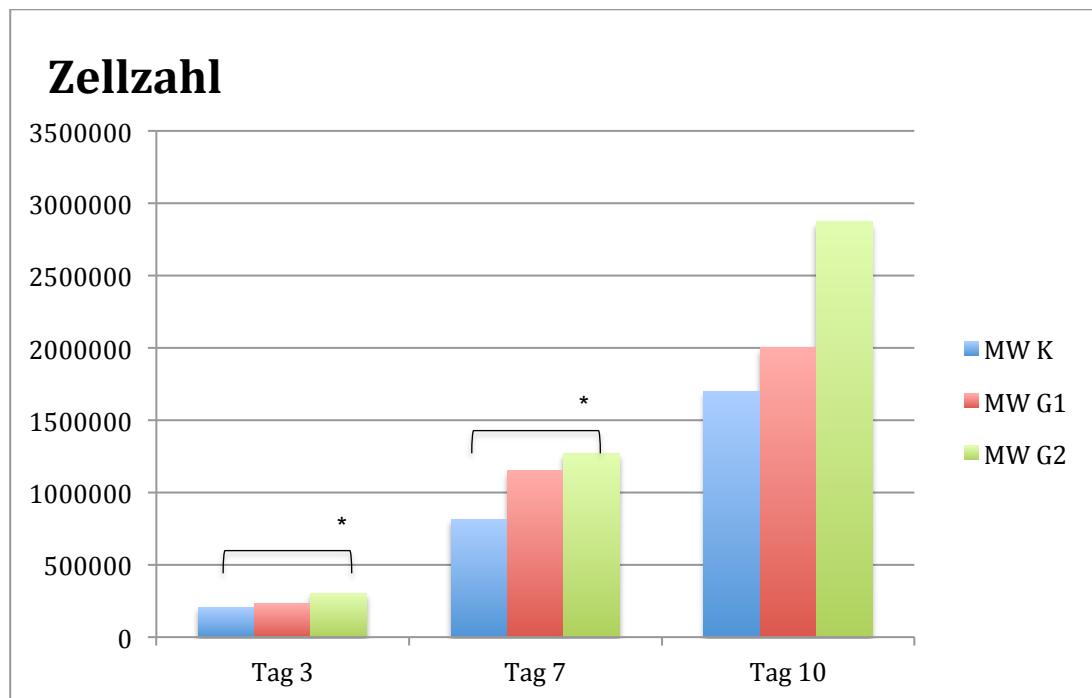


Abbildung 40: Zellzahl an Tag 3,7 und 10: Der Mittelwert (MW) Gruppe 2 (G2) hat an Tag 3 und 7 eine signifikant höhere Zellzahl als die Kontrolle (K) (t-Test: Tag 3: $p=0,02$, Tag 7: $p=0,041$, Tag 10: $p=0,089$). Gruppe 1 (G1) zeigt an allen Tagen eine höhere Anzahl an Zellen als K, aber nicht signifikant (t-Test Tag 3: $p=0,41$, Tag 7: $p=0,067$, Tag 10: $p=0,52$). G2 übertrifft auch G1 an allen Tagen ohne Signifikanz (t-Test Tag 3: $p=0,051$, Tag 7: $p=0,69$, Tag 10: $p=0,28$)

5.2.1.1. Tag 3

Die Anzahl der Zellen stieg in der Kontrollgruppe (K) auf einen Mittelwert von 208.333, in G1 im Mittel auf 235.417 und in G2 auf 304.167. G2 hatte signifikant mehr Zellen als K ($p=0,02$) und annähernd signifikant mehr als G1 ($p=0,051$). Zwischen G1 und K zeigte sich keine Signifikanz bei $p=0,41$. Die Standardabweichung (SABW) beträgt für K 61.577, bei G1 47.544 und bei G2 59.249.

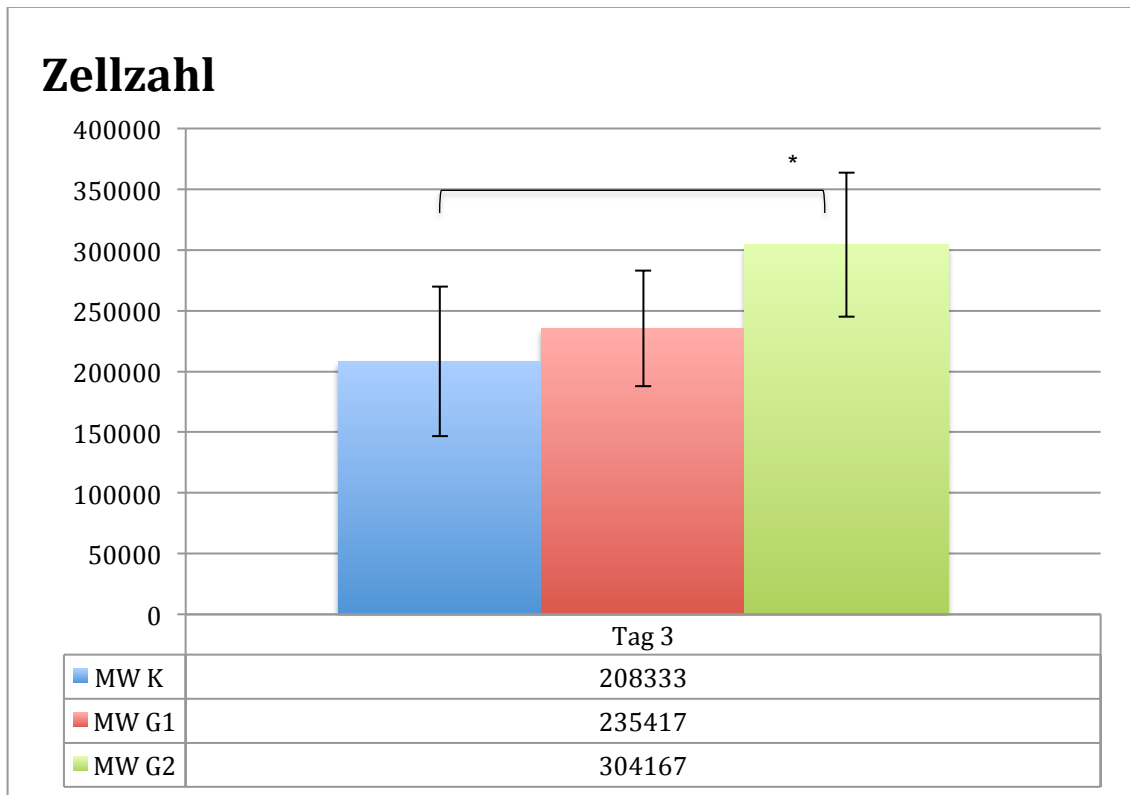


Abbildung 41: Zellzahl an Tag 3: G2 übertrifft im t-Test signifikant K ($p=0,02$) und G1 ($p=0,051$) fast signifikant, G1 ist nicht signifikant größer als K ($p=0,41$)

5.2.1.2. Tag 7

An Tag 7 wurden im Durchschnitt in K 81.4583, in G1 1.150.000 und in G2 1.266.667 Zellen gezählt. Erneut bestand Signifikanz zwischen G2 und der Kontrolle ($p=0,041$). Der Vergleich G1 und K zeigte sich fast signifikant ($p=0,067$). Zwischen den beiden Wachstumsfaktorengruppen wurde kein statistischer Unterschied erkannt ($p=0,68$). Die Standardabweichungen liegen bei 188.152 für K, 281.736 für G1 und für G2 bei 375486.

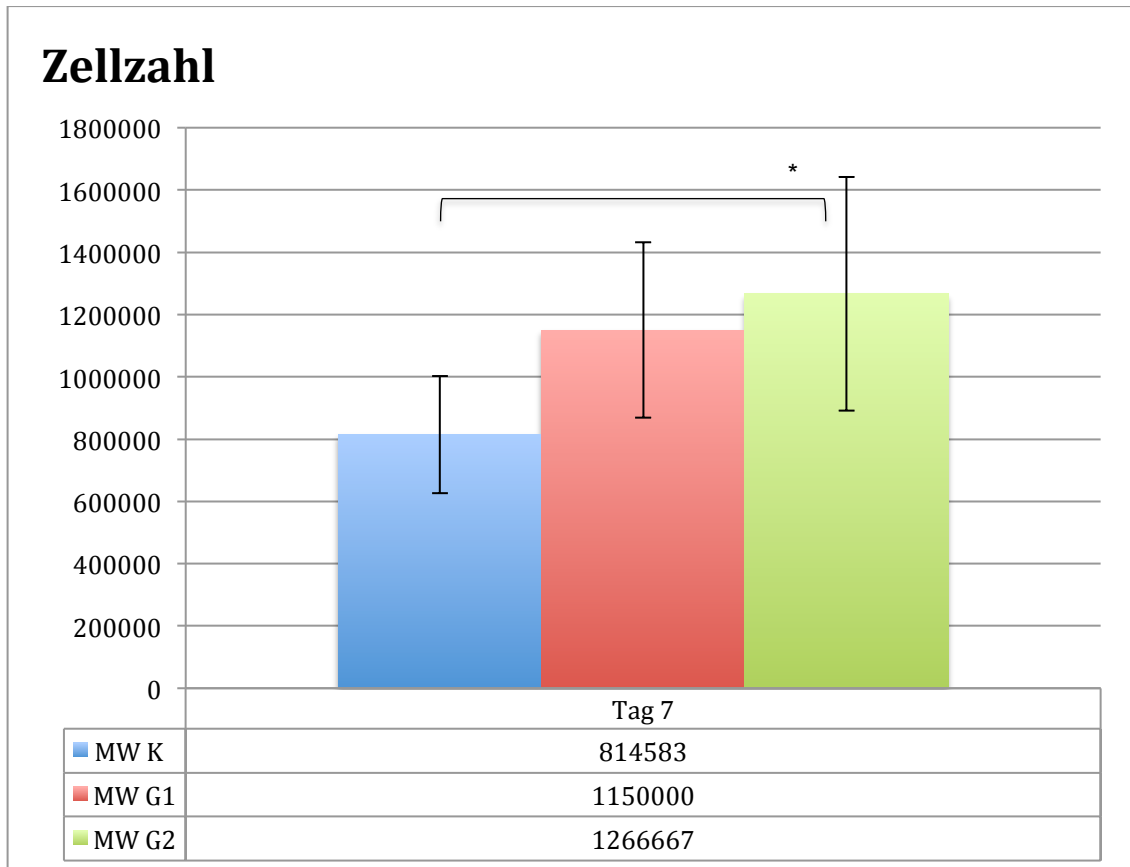


Abbildung 42: Zellzahl an Tag 7: G2 ist im t-Test signifikant größer als K ($p=0,041$) und größer als G1 ohne Signifikanz ($p=0,68$). G1 ist insignifikant größer als K ($p=0,067$).

5.2.1.3. Tag 10

Die Mittelwerte der Zellzahl lagen an Tag 10 in der Kontrollgruppe bei 1.697.917, in Gruppe 1 bei 2.000.000 und in Gruppe 2 bei 2.870.833. Die Standardabweichungen sind für K 694.011, in G1 438.035 und in G2 1.127.936. Die Gruppe 2 zeigte damit deutlich mehr Zellen als die Vergleichsgruppen, jedoch nur fast signifikant ($p=0,089$) gegenüber der Kontrollgruppe und nicht signifikant gegenüber Gruppe 1 ($p=0,28$). Ebenso wenig war der Unterschied zwischen G1 und K mit $p=0,52$ statistisch gesichert.

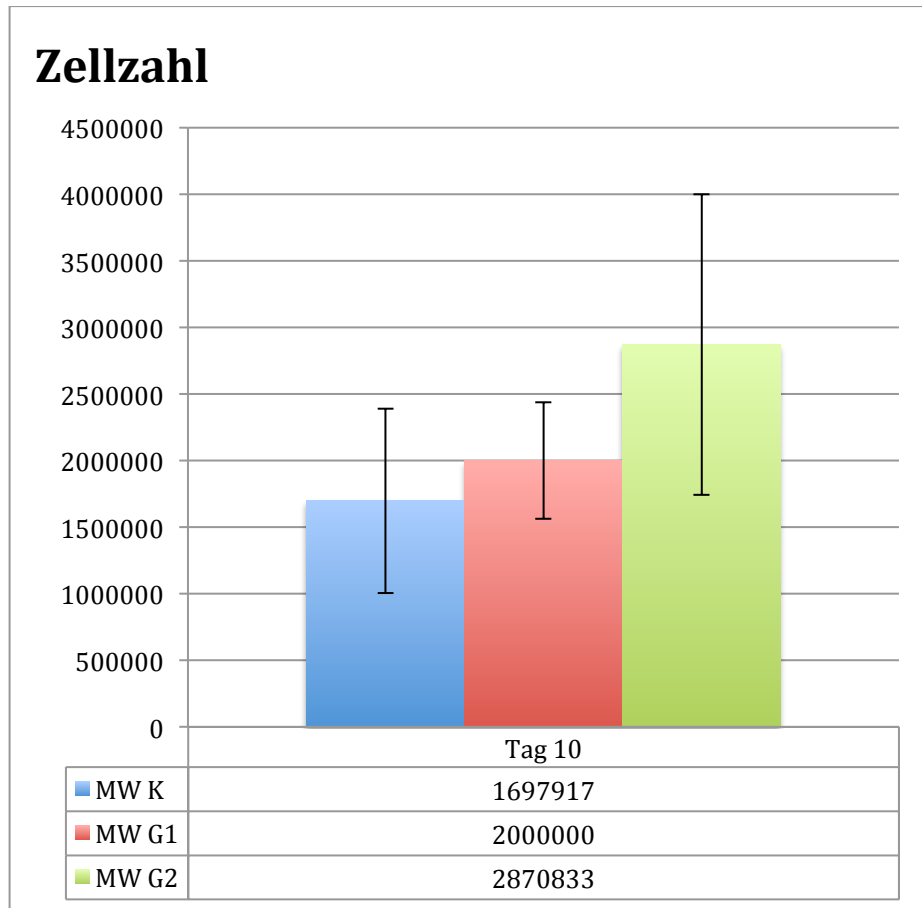


Abbildung 43: Zellzahl Tag 10: Die Zellzahl von G2 ist im *t*-Test nicht signifikant höher als G1 ($p=0,28$) und K ($p=0,089$), ebenso wie G1 im Vergleich zu K ($p=0,52$)

5.2.2. Extinktion im WST-1 Versuch

Es wurden die Differenzen zwischen der Extinktion im Well und den Leerwerten gemessen. Die Mittelwerte der Gruppen 1 und 2 zeigen an allen Tagen eine höhere Extinktion als die Kontrolle. An Tag 3 und 10 ist die Extinktion in Gruppe 2 höher als in Gruppe 1, welche sonst die höchste Extinktion zeigt.

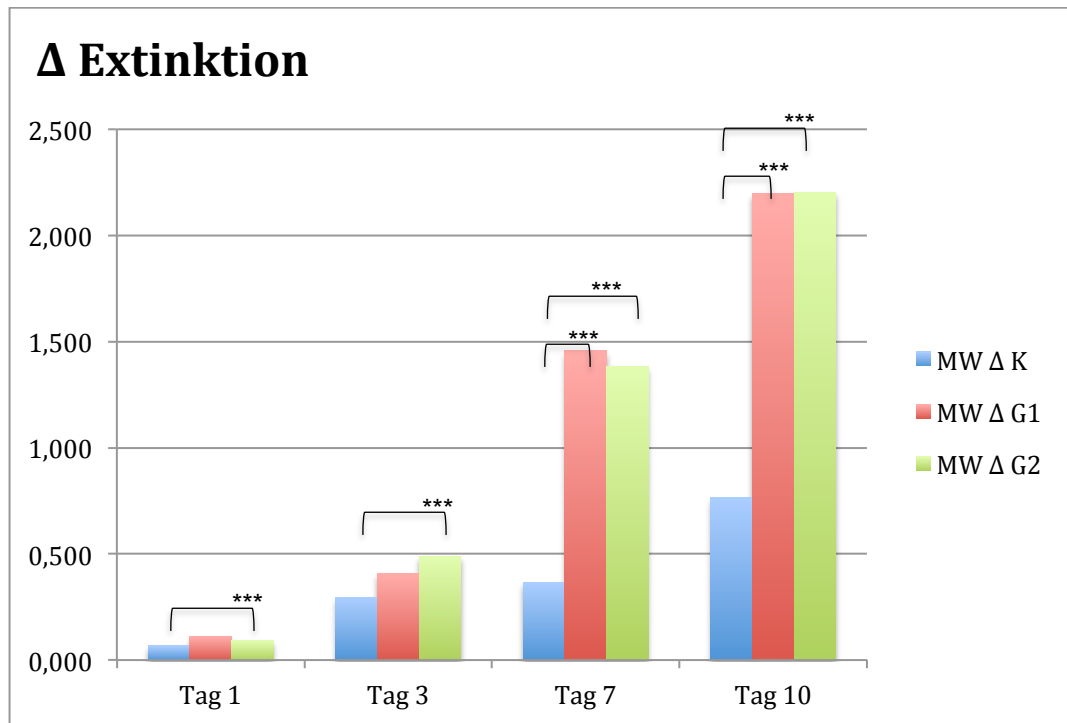


Abbildung 44: Extinktionsdifferenz an Tag 1,3,7 und 10: G1 hat eine größere Extinktionsdifferenz als K an allen Tagen, wobei Tag 7 und 10 signifikant sind (t-Test: Tag 1: $p=0,12$, Tag 3: $p=0,272$, Tag 7: $p<0,001$, Tag 10: $p<1 \times 10^{-7}$). G2 zeigt an allen Tagen eine signifikant höhere Differenz als K (t-Test: Tag 1: $p=0,00026$, Tag 3: $p<0,0001$, Tag 7: $p<0,001$, Tag 10: $p<1 \times 10^{-7}$). G2 übertrifft auch G1 an Tag 3 und 10, aber an Tag 1 und 7 ist es umgekehrt, jeweils ohne Signifikanz (t-Test Tag 1: $p=0,054$, Tag 3: $p=0,072$, Tag 7: $p=0,52$, Tag 10: $p=0,38$)

5.2.2.1. Tag 1

Nach einem Tag beträgt die mittlere Extinktionsdifferenz in der Kontrollgruppe 0,068, in Gruppe 1 0,113 und in Gruppe 2 0,091. Die Standardabweichungen liegen in Gruppe K bei 0,024, G1 0,052 und G2 0,048. Die Gruppe G2 zeigte statistisch mehr Extinktion im Mittel als die Kontrolle ($p=0,00026$). Die Größere Extinktion von Gruppe G1 gegenüber K ($p=0,12$) und G2 ($p=0,054$) waren fast signifikant.

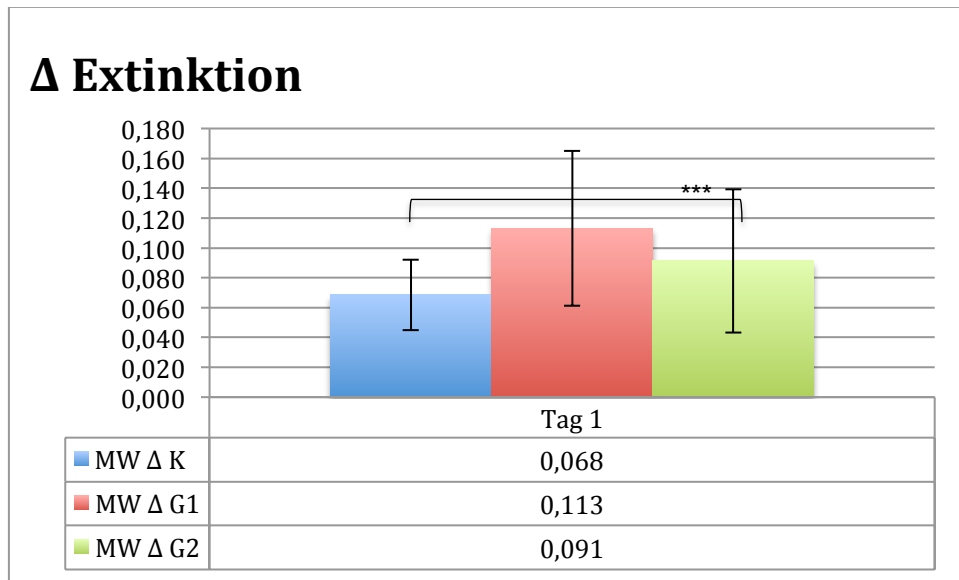


Abbildung 45: Extinktion an Tag 1: G2 übertrifft im *t*-Test signifikant K ($p<0,001$) und G1 ist nicht signifikant größer als K ($p=0,12$) und G2 ($p=0,054$)

5.2.2.2. Tag 3

Die mittlere Extinktionsdifferenz wuchs auf 0,295 (SABW 0,109) in K, 0,410 (SABW 0,165) in G1 und in G2 auf 0,488 (SABW 0,201). Damit zeigte sich in G2 mehr Extinktion als in Gruppe 1 und der Kontrolle. Für G2 war der Unterschied zur Kontrolle signifikant mit $p < 0,0001$ und der Unterschied zwischen G1 und G2 war mit $p = 0,072$ fast signifikant. Im Vergleich zwischen G1 und der Kontrolle konnte bei $p = 0,272$ keine Signifikanz gezeigt werden im T-Test.

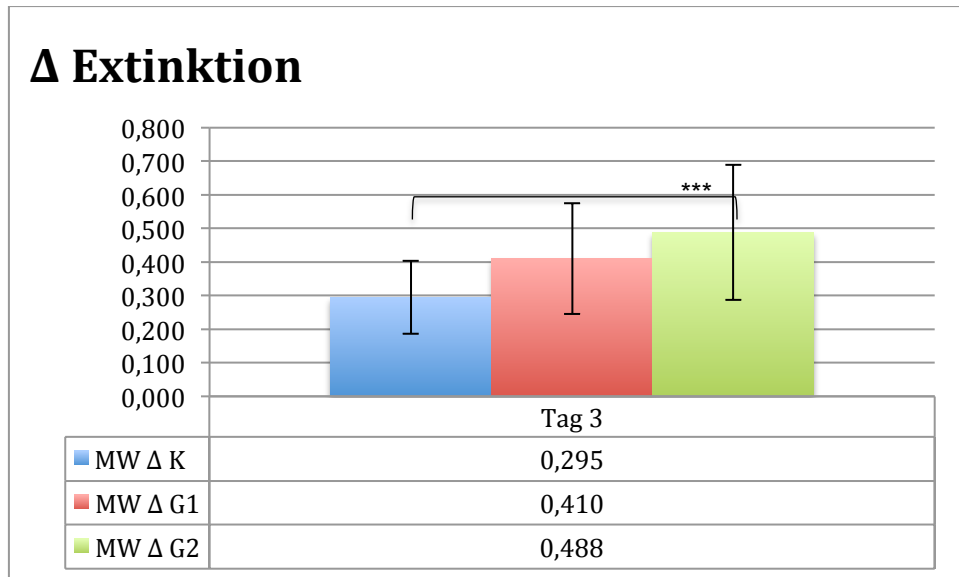


Abbildung 46: Extinktion an Tag 3: G2 übertrifft im t-Test signifikant K ($p < 0,0001$) und ist fast signifikant größer als G1 ($p = 0,072$). G1 ist K nicht signifikant überlegen ($p = 0,272$)

5.2.2.3. Tag 7

Die Extinktionsdifferenzen legten weiter zu und lagen am 7. Tag bei 0,365 (SABW 0,083) in der Kontrollgruppe, bei 1,457 (SABW 0,328) in Gruppe 1 und bei 1,384 (SABW 0,570) in Gruppe 2. Die beiden Wachstumsfaktorengruppen zeigten beide statistisch signifikant mehr Extinktion als die Kontrolle (jeweils $p < 0,001$). Gruppe 1 war ohne statistischen Unterschied größer als Gruppe 2 ($p = 0,52$).

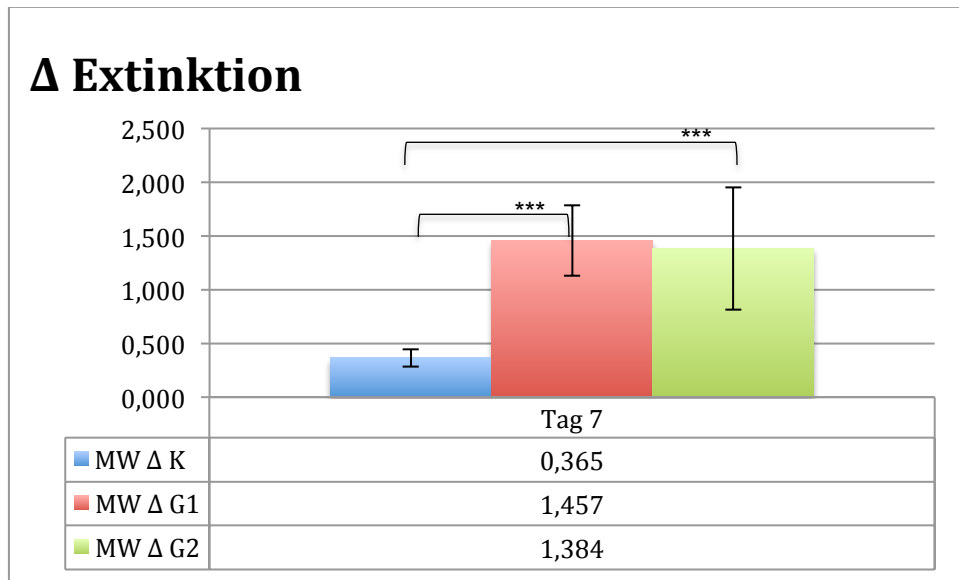


Abbildung 47: Extinktion an Tag 7: G1 und G2 übertreffen im t-Test signifikant K (jeweils $p < 0,001$) und G1 ist nicht signifikant größer als G2 ($p = 0,52$)

5.2.2.4. Tag 10

Zum Abschluss des WST-1 Tests zeigte sich die Extinktionsdifferenz in K bei 0,763 (SABW 0,202), in G1 bei 2,197 (SABW 0,282) und in G2 bei 2,202 (SABW 0,201). Somit war G2 größer als G1 und K. Erneut zeigten sich die beiden Wachstumsfaktorengruppen jeweils bei $p < 1 \times 10^{-7}$ statistisch signifikant größer als die Kontrolle. Zwischen den zwei stimulierten Gruppen trat kein statistischer Unterschied auf ($p=0,38$).

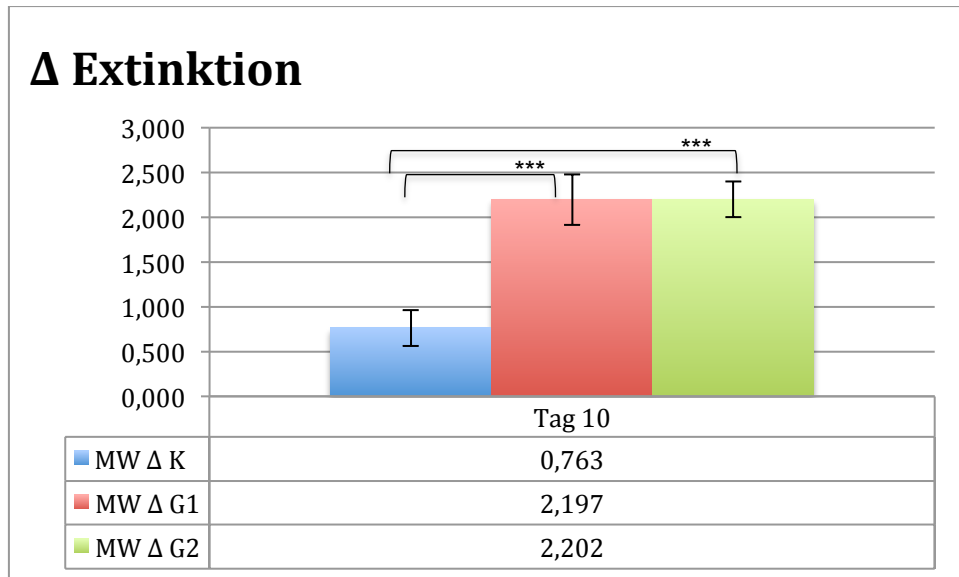


Abbildung 48: Extinktion an Tag 10: G1 und G2 übertreffen im t-Test signifikant K (jeweils $p < 1 \times 10^{-7}$) und G2 ist nicht signifikant größer als G1 ($p=0,38$)

5.3. *Genexpression*

5.3.1. Qualitativer Gennachweis

Es wurde versucht in der Agarose-Gelelektrophorese Tenomodulin (TM 123bp) und Scleraxis (SCX 224bp) nachzuweisen. Als Kontrolle wurde GAPDH (86bp) verwendet. Tenomodulin und Scleraxis konnten in keiner Probe nachgewiesen werden, während GAPDH in jeder nachgewiesen wurde.

1T3G1 bedeutet 1. Durchlauf Tag 3 Gruppe 1. Die restlichen Bezeichnungen verhalten sich analog.

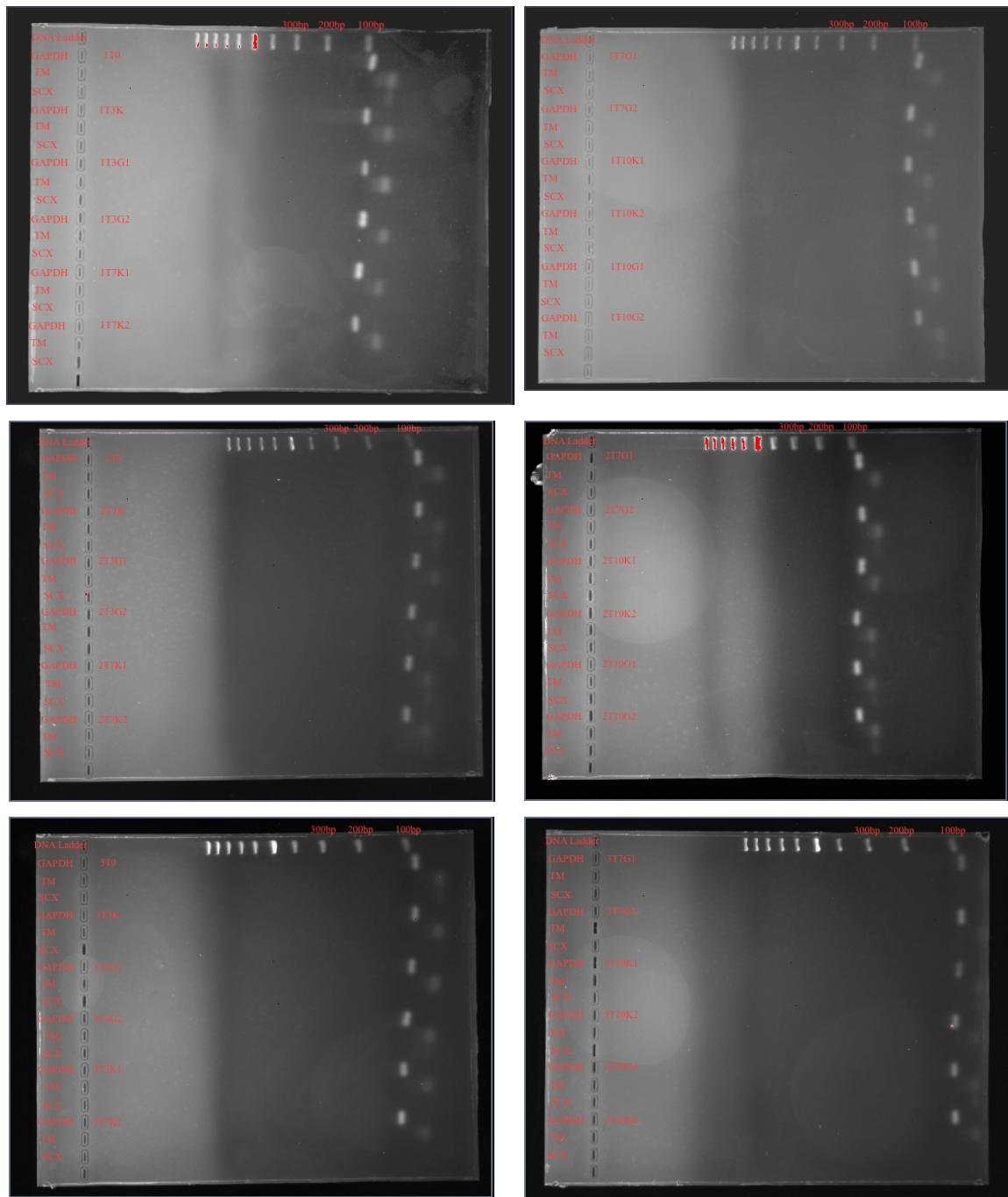


Abbildung 49: Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von GAPDH, Scleraxis (SCX) und Tenomodulin (TM): Es konnte in jeder Probe GAPDH nachgewiesen werden. Für SCX und TM zeigen sich unspezifische Bindungen und daher kein Nachweis.

5.3.2. Quantitativer Gennachweis

Mit Hilfe des LightCyclers wurden die C_t -Werte für die einzelnen cDNAs der jeweils getesteten Proteine bestimmt. Niedrige C_t -Werte sprechen für eine hohe Konzentration der cDNA in der jeweiligen Probe. Die C_t -Werte wurden, wie bereits oben beschrieben mit Hilfe der Delta/Delta Methode errechnet (70) und als Ratios zur Genexpression von EF1A (Elongationsfaktor 1 A), einem typischen Housekeeping Gen, dargestellt. Ratios größer als eins bedeuten eine höhere Genexpression und Ratios kleiner eins eine niedrigere Genexpression im Vergleich zum Ausgangswert der an Tag null die Ratio eins hat.

5.3.2.1. GAPDH

GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ist ein Enzym der Glykolyse und ist in jeder Zelle vorzufinden (71). Es ist ein Housekeeping Gen. Mit C_t -Werten von 15 bis 22 zeigt sich durchaus eine hohe Expression von GAPDH, welche in den Fibroblasten nachgewiesen werden konnte

GAPDH	Tag 3	Tag 7	Tag 10
MW K	1,68	0,41	0,93
MW G1	3,62	2,99	4,01
MW G2	26,10	0,50	1,63

Abbildung 50: Tabelle der Ratios der GAPDH C_t -Mittelwerte

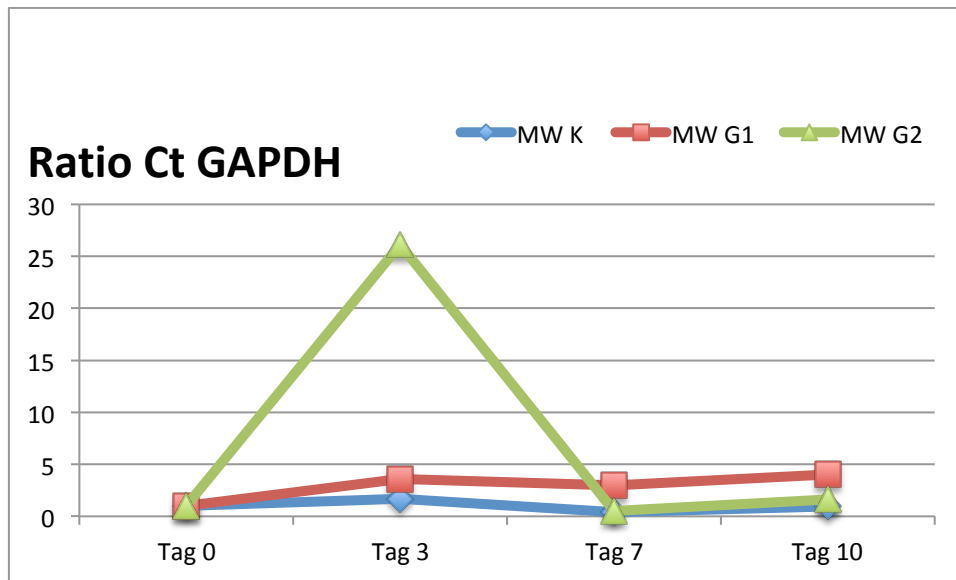


Abbildung 51: Genexpression GAPDH Tag 3: G1 und G2 übertreffen im t-Test nicht signifikant K ($p=0,52$ bzw. für G2 $p=0,34$) und G2 ist nicht signifikant größer als G1 ($p=0,43$).

Genexpression GAPDH Tag 7: G1 ist nicht signifikant größer als K ($p=0,43$) und G2 ($p=0,45$) im t-Test. G2 ist K nicht signifikant überlegen ($p=0,73$).

Genexpression GAPDH Tag 10: G1 zeigt sich nicht signifikant größer als K ($p=0,29$) und G2 ($p=0,44$) im t-Test. G2 liegt nicht signifikant über K ($p=0,61$).

Am dritten Tag betrugen die Ratios der GAPDH in der Kontrollgruppe 1,68 (SABW 2,00), in der Gruppe 1 3,62 (SABW 9,43) und in der Gruppe 2 26,10 (SABW 39,33). Die Unterschiede waren nicht signifikant bei G1/K ($p=0,52$), G2/K ($p=0,34$) und G1/G2 ($p=0,43$).

Die Genexpressionen lagen an Tag 7 in der Kontrollgruppe bei 0,41 (SABW 0,25), in der Gruppe 1 bei 2,99 (SABW 5,10) und in der Gruppe 2 bei 0,50 (SABW 0,38). Es konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden bei G1/K ($p=0,43$), G2/K ($p=0,73$) und G1/G2 ($p=0,45$).

Die Ratios der GAPDH erreichten an Tag 10 in der Kontrollgruppe 0,93 (SABW 0,81), in der Gruppe 1 4,01 (SABW 4,32) und in der Gruppe 2 1,63 (SABW 2,08). Die Unterschiede waren nicht signifikant bei G1/K ($p=0,29$), G2/K ($p=0,61$) und G1/G2 ($p=0,44$). G1 und G2 bildeten somit deutlich mehr GAPDH als die Ausgangprobe.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Werte in allen drei Gruppen an Tag 3 hoch waren, im Verlauf am 7. Tag absanken und am 10. Tag wieder anstiegen. G1 und G2 lagen an allen drei Messpunkten über der Kontrolle.

5.3.2.2. Kollagen Typ I

Für Sehnen ist, wie bereits oben beschrieben Kollagen Typ I ein zentrales Protein. Dies konnte auch in den Fibroblasten nachgewiesen werden mit einer durchaus hohen Expression bei C_t -Werten von 13 bis 19.

Kollagen Typ I	Tag 3	Tag 7	Tag 10
MW K	2,72	0,84	1,99
MW G1	13,80	0,41	1,47
MW G2	7,62	0,43	1,97

Abbildung 52: Tabelle der Ratios der Kollagen Typ I C_t -Mittelwerte

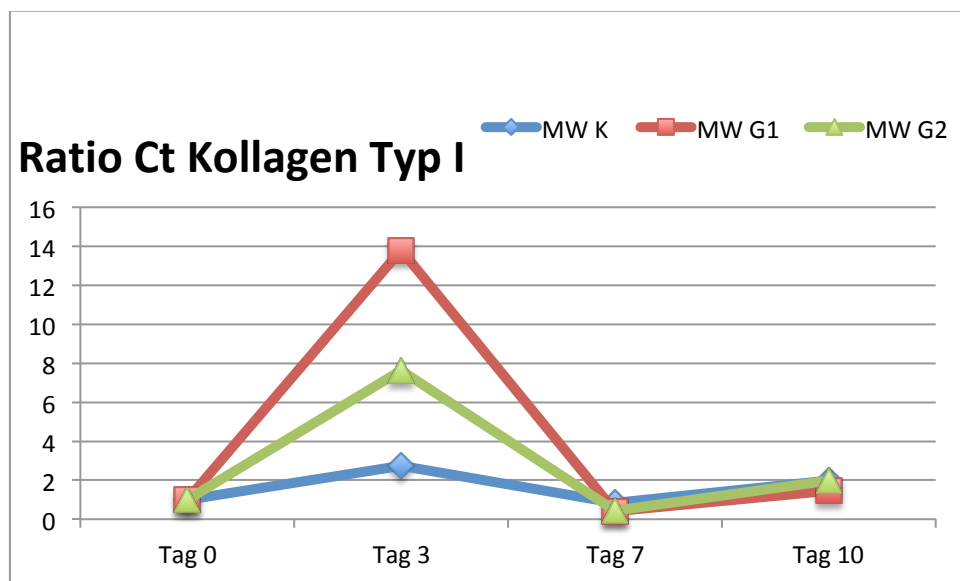


Abbildung 53: Genexpression Kollagen Typ I Tag 3: G1 ist größer als G2 und K. Es zeigen sich keine Signifikanzen im t-Test bei G1/K ($p=0,47$), G2/K ($p=0,48$) und G1/G2 ($p=0,90$).

Genexpression Kollagen Typ I Tag 7: G1 und G2 unterliegen im t-Test nicht signifikant K ($p=0,39$ bzw. für G2 $p=0,56$) und G2 ist nicht signifikant größer als G1 ($p=0,70$). Genexpression Kollagen Typ I Tag 10: G1 zeigt sich nicht signifikant kleiner als K ($p=0,81$) und G2 ($p=0,83$) im t-Test. G2 liegt nicht signifikant unter K ($p=0,99$).

An Tag 3 betrugen die Ratios des Kollagen Typ I in der Kontrollgruppe 2,72 (SABW 3,80), in der Gruppe 1 13,80 (SABW 19,34) und in der Gruppe 2 7,61 (SABW 12,47). Die Unterschiede waren nicht signifikant bei G1/K ($p=0,47$), G2/K ($p=0,48$) und G1/G2 ($p=0,90$).

Die Genexpressionen lagen am 7. Tag in der Kontrollgruppe 0,84 (SABW 0,99), in der Gruppe 1 0,41 (SABW 0,23) und in der Gruppe 2 0,43 (SABW 0,57). Es konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden bei G1/K ($p=0,39$), G2/K ($p=0,56$) und G1/G2 ($p=0,70$).

Die Ratios des Kollagen Typ I erreichten an Tag 10 in der Kontrollgruppe 1,99 (SABW 2,86), in der Gruppe 1 1,46 (SABW 2,14) und in der Gruppe 2 1,97 (SABW 3,06). Die Unterschiede waren nicht signifikant bei G1/K ($p=0,81$), G2/K ($p=0,99$) und G1/G2 ($p=0,83$). Die Kollagen Typ I Synthese stieg in allen Gruppen deutlich im Vergleich zur Ausgangsprobe.

Insgesamt beobachtete man auch für Kollagen Typ I höhere Ratios am Tag 3, welche zum 7. Tag sanken und an Tag 10 wieder größer wurden. In den Wachstumsfaktorengruppen erkannte man höhere Niveaus an Tag 3, welche stärker fielen, jedoch auch stärker wieder zunahmen.

5.3.2.3. Kollagen Typ III

Ein weiteres sehr wichtiges Element der extrazellulären Matrix von Sehnen ist, wie bereits erwähnt, Kollagen Typ III. Die Fibroblasten im Versuch besaßen einige Mengen an Kollagen Typ III mRNA, was die C_t -Werte von 15 bis 27 für die cDNA zeigen.

Kollagen Typ III	Tag 3	Tag 7	Tag 10
MW K	0,72	1,04	10,92
MW G1	1,56	0,25	9,98
MW G2	4,27	1,74	7,97

Abbildung 54: Tabelle der Ratios der Kollagen Typ III C_t -Mittelwerte

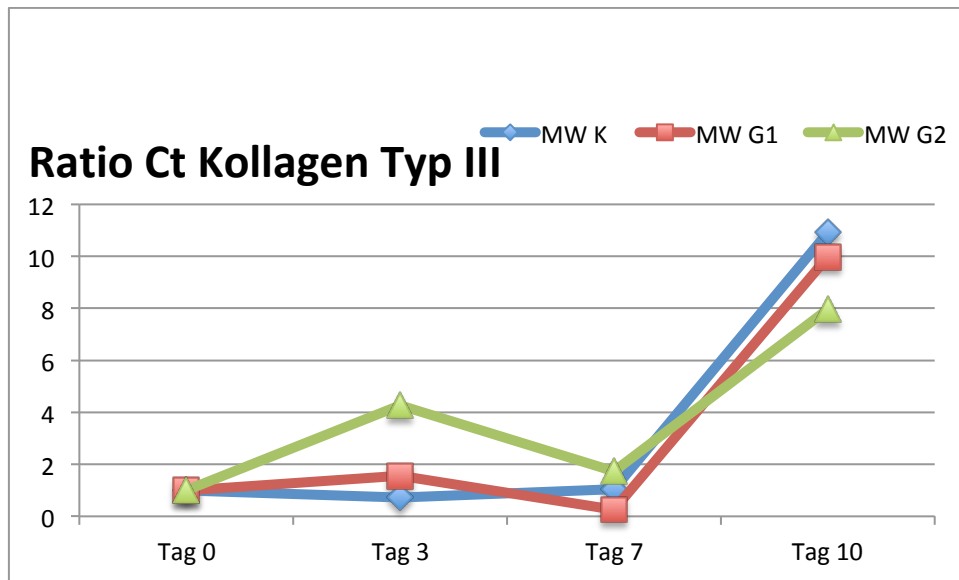


Abbildung 55: Genexpression Kollagen Typ III Tag 3: G1 und G2 übertreffen im t-Test nicht signifikant K ($p=0,45$ bzw. für G2 $p=0,44$) und G2 ist nicht signifikant größer als G1 ($p=0,71$). Genexpression Kollagen Typ III Tag 7: G2 ist nicht signifikant größer als K ($p=0,71$) und G1 ($p=0,40$) im t-Test. G1 ist nicht signifikant kleiner als K ($p=0,35$). Genexpression Kollagen Typ III Tag 10: K zeigt sich nicht signifikant größer als G1 ($p=0,95$) und G2 ($p=0,83$) im t-Test. G1 liegt nicht signifikant über G2 ($p=0,88$).

Am dritten Tag betrugen die Ratios des Kollagen Typ III im Vergleich zur Ausgangsprobe des Durchlaufs in der Kontrollgruppe 0,72 (SABW 1,24), in der Gruppe 1 1,56 (SABW 4,10) und in der Gruppe 2 4,27 (SABW 7,03). Die Unterschiede waren nicht signifikant bei G1/K ($p=0,453$), G2/K ($p=0,44$) und G1/G2 ($p=0,71$).

Die Genexpressionen lagen am 7. Tag in der Kontrollgruppe bei 1,04 (SABW 1,30), in der Gruppe 1 bei 0,25 (SABW 0,22) und in der Gruppe 2 bei 1,74 (SABW 2,73). Es konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden bei G1/K ($p=0,35$), G2/K ($p=0,71$) und G1/G2 ($p=0,40$).

Die Ratios des Kollagen Typ III waren an Tag 10 in der Kontrollgruppe 10,92 (SABW 18,26), in der Gruppe 1 9,98 (SABW 17,04) und in der Gruppe 2 7,97 (SABW 13,60). Die Unterschiede zeigten sich nicht signifikant bei G1/K ($p=0,95$), G2/K ($p=0,83$) und G1/G2 ($p=0,88$). In der Analyse ergab sich eine deutlich höhere Expression von Kollagen Typ III in allen Gruppen als bei den Ausgangszellen.

In der Gesamtbetrachtung gingen die Werte von G1 und G2 zwischen dem 3. und dem 7. Tag zurück und zeigten zum 10. Tag starke Anstiege auf die höchsten Level, die auch die Kontrolle durchlief, ohne am 7. Tag abzufallen.

5.3.2.4. Tenascin C

Ebenso zu den typischen Proteinen der EZM der Sehne zählt Tenascin C, was bereits dargelegt wurde. Tenascin C wurde von den Zellen exprimiert mit C_t -Werten von 17 bis 28.

Tenascin C	Tag 3	Tag 7	Tag 10
MW K	1,15	2,61	34,90
MW G1	47,26	3,91	60,12
MW G2	32,24	15,46	47,15

Abbildung 56: Tabelle der Ratios der Tenascin C C_t -Mittelwerte

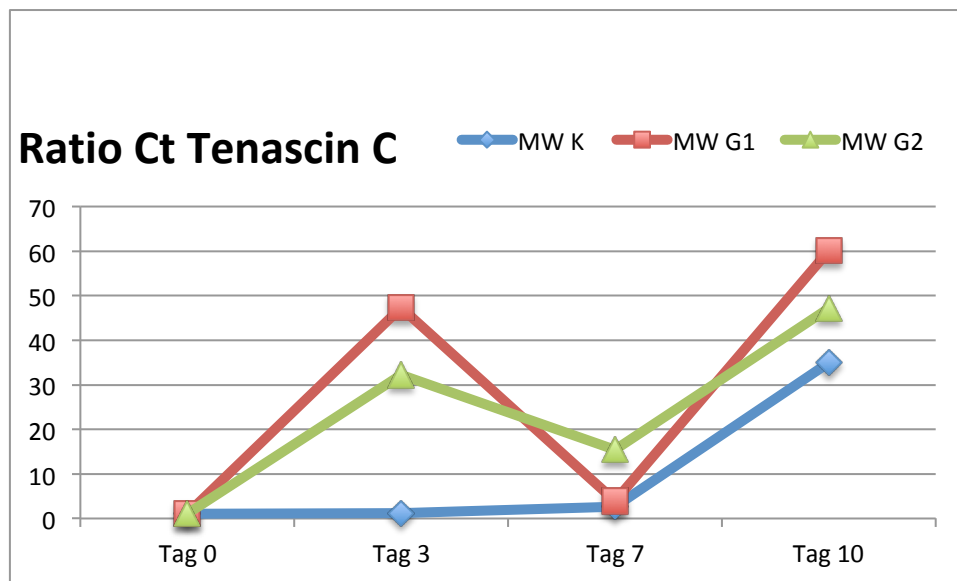


Abbildung 57: Genexpression Tenascin C Tag 3: G1 ist größer als G2 und K. Es zeigen sich keine Signifikanzen im t-Test bei G1/K ($p=0,38$), G2/K ($p=0,36$) und G1/G2 ($p=0,57$).

Genexpression Tenascin C Tag 7: G1 und G2 übertreffen im t-Test nicht signifikant K ($p=0,67$ bzw. für G2 $p=0,42$) und G2 ist nicht signifikant größer als G1 ($p=0,57$). Genexpression Tenascin C Tag 10: G1 ist größer als G2 und K. es zeigen sich keine Signifikanzen im t-Test bei G1/K ($p=0,73$), G2/K ($p=0,84$) und G1/G2 ($p=0,87$).

An Tag 3 betrugen die Ratios des Tenascin C in der Kontrollgruppe 1,15 (SABW 2,00), in der Gruppe 1 47,26 (SABW 160,92) und in der Gruppe 2 32,23 (SABW 52,70). Die Unterschiede präsentierten sich nicht signifikant bei G1/K ($p=0,38$), G2/K ($p=0,36$) und G1/G2 ($p=0,57$).

Die Genexpressionen lagen am 7. Tag in der Kontrollgruppe 2,61 (SABW 3,39), in der Gruppe 1 3,91 (SABW 1,91) und in der Gruppe 2 15,46 (SABW 24,60). Es konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden bei G1/K ($p=0,67$), G2/K ($p=0,42$) und G1/G2 ($p=0,57$).

Die Ratios des Tenascin C betrugen an Tag 10 in der Kontrollgruppe 34,90 (SABW 59,35), in der Gruppe 1 60,12 (SABW 103,08) und in der Gruppe 2 47,15 (SABW 80,47). Die Unterschiede waren nicht signifikant bei G1/K ($p=0,73$), G2/K ($p=0,84$) und G1/G2 ($p=0,87$). Es konnte eine deutliche Zunahme an Tenascin C in allen Gruppen festgestellt werden, wobei diese in den Wachstumsfaktorengruppen größer war.

Insgesamt erkannte man für G1 und G2 auch bei Tenascin C zunächst höhere Werte an Tag 3, die zum 7. Tag sanken und daraufhin an Tag 10 höher ausfielen. G1 und G2 waren über das gesamte Experiment größer als die Kontrolle.

5.3.2.5. Decorin

Ein weiteres bedeutendes Strukturelement der Sehne ist Decorin, was bereits ausgeführt wurde. In den Fibroblasten wird dies produziert, was sich anhand der C_t -Werte von 15 bis 23 der Proben zeigen ließ.

Decorin	Tag 3	Tag 7	Tag 10
MW K	0,19	1,33	2,18
MW G1	0,46	0,19	1,58
MW G2	1,65	0,19	1,19

Abbildung 58: Tabelle der Ratios der Decorin C_t -Mittelwerte

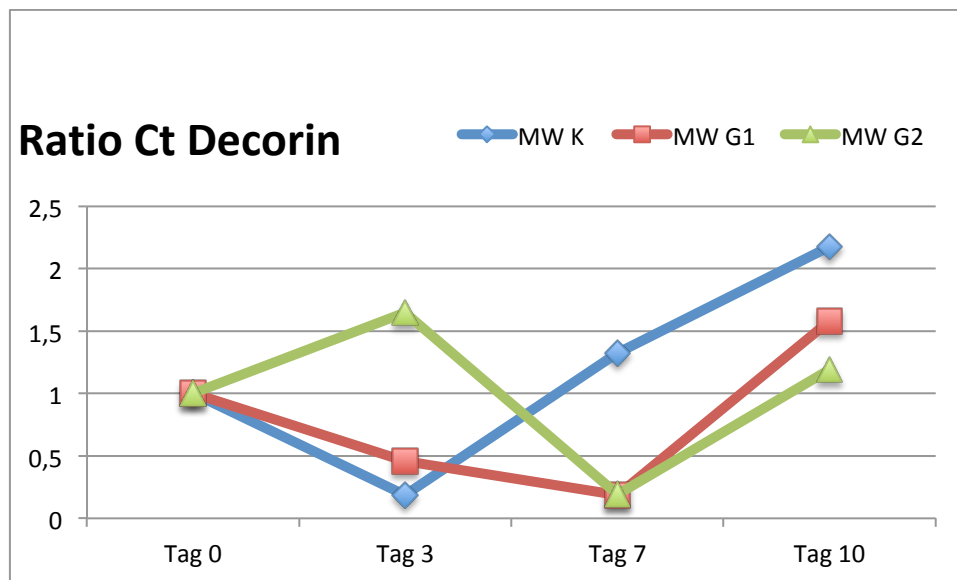


Abbildung 59: Genexpression Decorin Tag 3: G2 ist nicht signifikant größer als K ($p=0,36$) und G1 ($p=0,59$) im t -Test. G1 ist nicht signifikant größer als K ($p=0,46$). Genexpression Decorin Tag 7: K zeigt sich nicht signifikant größer als G1 ($p=0,34$) und G2 ($p=0,34$) im t -Test. G2 liegt nicht signifikant über G1 ($p=0,97$). Genexpression Decorin Tag 10: K stellt sich nicht signifikant größer dar als G1 ($p=0,78$) und G2 ($p=0,62$) im t -Test. G1 ist nicht signifikant größer als G2 ($p=0,82$).

An Tag 3 betrugen die Ratios des Decorins in der Kontrollgruppe 0,19 (SABW 0,32), in der Gruppe 1 0,46 (SABW 1,12) und in der Gruppe 2 1,65 (SABW 2,44). Die Unterschiede waren nicht signifikant bei G1/K ($p=0,46$), G2/K ($p=0,36$) und G1/G2 ($p=0,59$).

Die Genexpressionen lagen am 7. Tag in der Kontrollgruppe bei 1,32 (SABW 1,81), in der Gruppe 1 bei 0,19 (SABW 0,17) und in der Gruppe 2 bei 0,19 (SABW 0,12). Es konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden bei G1/K ($p=0,34$), G2/K ($p=0,34$) und G1/G2 ($p=0,97$).

Die Ratios des Decorins erreichten an Tag 10 in der Kontrollgruppe 2,18 (SABW 2,71), in der Gruppe 1 1,58 (SABW 2,24) und in der Gruppe 2 1,19 (SABW 1,64). Die Unterschiede waren nicht signifikant bei G1/K ($p=0,78$), G2/K ($p=0,62$) und G1/G2 ($p=0,82$). In allen Fibroblasten lässt eine Zunahme der Expression von Decorin im Vergleich zur Ausgangskontrolle beschreiben.

Im Verlauf war für G1 und G2 ein Abfallen von Tag 3 zu Tag 7 zu messen und auch wieder der Anstieg der Ratios zum 10. Tag. Außerdem zeigte die Kontrollgruppe über die Tage einen mutmaßlich linearen Verlauf und übertraf an beiden letzten Messpunkten die Wachstumsfaktorengruppen.

5.3.2.6. Kollagen Typ II

Als knorpeltypisches Strukturprotein wurde Kollagen Typ II als Kontrolle verwendet. Die Synthese von Kollagen Typ II durch die Fibroblasten war sehr niedrig und lag bei Ct-Werten von 31 bis 38.

Kollagen Typ II	Tag 3	Tag 7	Tag 10
MW K	79,69	15,24	3,10
MW G1	40,60	7,38	7,42
MW G2	14,08	14,70	2,91

Abbildung 60: Tabelle der Ratios der Kollagen Typ II Ct-Mittelwerte

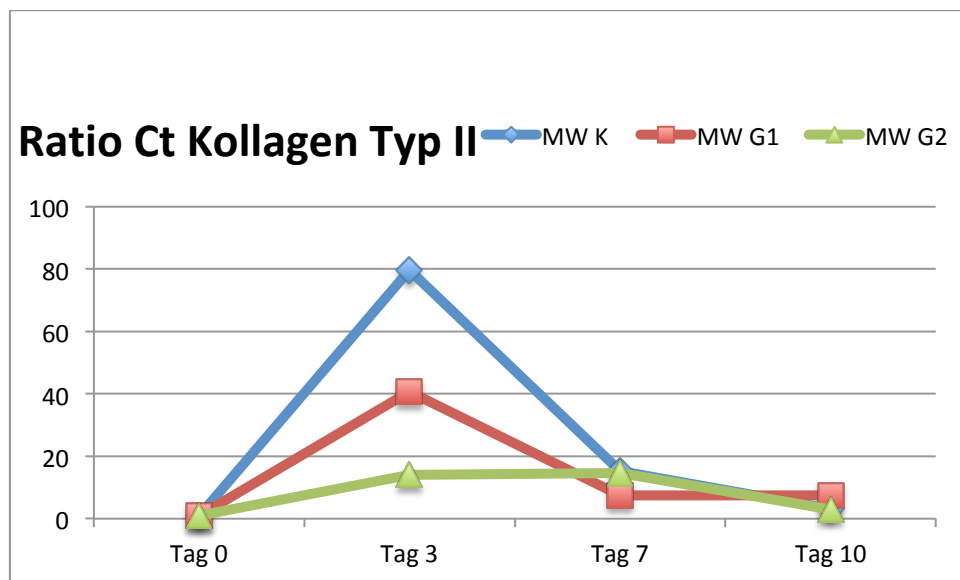


Abbildung 61: Genexpression Kollagen Typ II Tag 3: G1 und G2 unterliegen im t-Test nicht signifikant K ($p=0,29$ bzw. für G2 $p=0,38$) und G1 ist nicht signifikant größer als G2 ($p=0,34$).

Genexpression Kollagen Typ II Tag 7: G1 und G2 sind im t-Test nicht signifikant kleiner als K ($p=0,49$ bzw. für G2 $p=0,97$) und G2 ist nicht signifikant größer als G1 ($p=0,61$).

Genexpression Kollagen Typ II Tag 10: G1 ist nicht signifikant größer als K ($p=0,38$) und G2 ($p=0,38$) im t-Test. G2 ist K nicht signifikant unterlegen ($p=0,73$).

Am dritten Tag betrugen die Ratios des Kollagen Typ II im Vergleich zur Ausgangsprobe des Durchlaufs in der Kontrollgruppe 79,69 (SABW 112,15), in der Gruppe 1 40,60 (SABW 1,32) und in der Gruppe 2 14,08 (SABW 20,14). Die

Unterschiede waren nicht signifikant bei G1/K ($p=0,29$), G2/K ($p=0,38$) und G1/G2 ($p=0,34$).

Die Genexpressionen lagen am 7. Tag in der Kontrollgruppe bei 15,24 (SABW 14,18), in der Gruppe 1 bei 7,38 (SABW 11,07) und in der Gruppe 2 bei 14,70 (SABW 19,73). Es konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden bei G1/K ($p=0,49$), G2/K ($p=0,97$) und G1/G2 ($p=0,61$).

Die Ratios des Kollagen Typ II waren an Tag 10 in der Kontrollgruppe 3,10 (SABW 2,24), in der Gruppe 1 7,42 (SABW 7,21) und in der Gruppe 2 2,91 (SABW 3,23). Die Unterschiede zeigten sich nicht signifikant bei G1/K ($p=0,38$), G2/K ($p=0,94$) und G1/G2 ($p=0,38$).

Insgesamt fielen alle 3 Gruppen bei der Expressierung von Kollagen Typ II über den Gesamtversuch ab, wobei an Tag 3 ein relativ hohes Niveau über alle Gruppen zu erkennen war.

5.3.2.7. Osteocalcin

Im Knochen ist Osteocalcin ein wichtiger Bestandteil, welcher als Kontrolle zur Differenzierung der Fibroblasten verwendet wurde. Die Expressierung war mit C_t - Werten von 25 bis 32 niedrig.

Osteocalcin	Tag 3	Tag 7	Tag 10
MW K	3,01	0,91	1,01
MW G1	1,98	1,29	0,84
MW G2	2,67	0,91	2,44

Abbildung 62: Tabelle der Ratios der Osteocalcin C_t -Mittelwerte

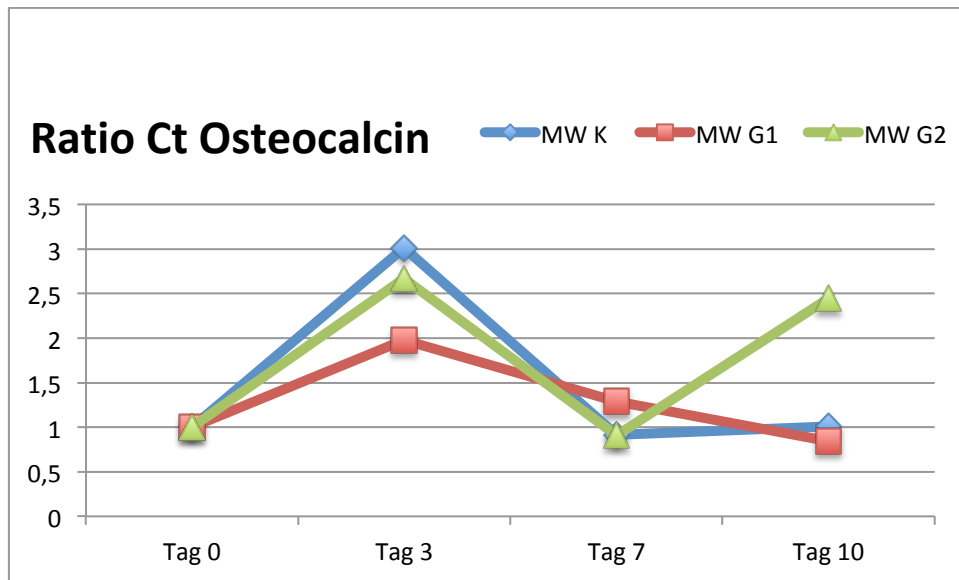


Abbildung 63: Genexpression Osteocalcin Tag 3: G1 zeigt sich nicht signifikant kleiner als K ($p=0,53$) und G2 ($p=0,29$) im t-Test. G2 liegt nicht signifikant unter K ($p=0,92$). Genexpression Osteocalcin Tag 7: G1 ist größer als G2 und K. Es zeigen sich keine Signifikanzen im t-Test G1/K ($p=0,79$), G2/K ($p=0,99$) und G1/G2 ($p=0,79$). Genexpression Osteocalcin Tag 10: G2 übertrifft im t-Test nicht signifikant K ($p=0,42$) und G1 ($p=0,36$) und G1 ist nicht signifikant kleiner als K ($p=0,74$).

An Tag 3 betrugen die Ratios des Osteocalcins in der Kontrollgruppe 3,01 (SABW 5,19), in der Gruppe 1 1,98 (SABW 0,82) und in der Gruppe 2 2,67 (SABW 2,29). Die Unterschiede waren nicht signifikant bei G1/K ($p=0,53$), G2/K ($p=0,92$) und G1/G2 ($p=0,29$).

Die Genexpressionen lagen am 7. Tag in der Kontrollgruppe bei 0,91 (SABW 0,56), in der Gruppe 1 bei 1,29 (SABW 2,17) und in der Gruppe 2 bei 0,91 (SABW 0,72). Es konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden bei G1/K ($p=0,79$), G2/K ($p=0,99$) und G1/G2 ($p=0,79$).

Die Ratios des Osteocalcins erreichten an Tag 10 in der Kontrollgruppe 1,01 (SABW 0,72), in der Gruppe 1 0,84 (SABW 0,39) und in der Gruppe 2 2,44 (SABW 2,64). Die Unterschiede waren nicht signifikant bei G1/K ($p=0,74$), G2/K ($p=0,42$) und G1/G2 ($p=0,36$).

Ebenso wie bei anderen mRNAs fielen die Ratios vom 3. zum 7. Tag und hielten sich dann mit Ausnahme von G2 im Rahmen des Ausgangslevels.

5.3.2.8. Überblick Ergebnisse quantitative Genexpression

Es konnten GAPDH, Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Tenascin C und Decorin, welche für Sehnen charakteristisch sind, mit niedrigen C_t -Werten und damit hoher mRNA Konzentration in den Zellen nachgewiesen werden. Für Osteocalcin ergaben sich hohe und für Kollagen Typ II sehr hohe C_t -Werte, was für eine niedrige Expression spricht. Insbesondere die Zellen mit Wachstumsfaktoren zeigten an Tag 3 eine stark erhöhte Expression von GAPDH, Kollagen Typ I und 3 sowie Tenascin C. Hinsichtlich GAPDH, Kollagen Typ I und 3, Tenascin C und Decorin war bei G1 und G2 ein Muster erkennbar, im Sinne, dass es zum 3. Tag zu einem Anstieg der Ratios kam, welche an Tag 7 wieder niedriger ausfielen, wobei dann wieder am 10. Tag höhere Werte zu messen waren. Die Ratios speziell an Tag 10 unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht signifikant. An Tag 10 wurde in allen Gruppen mehr Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Tenascin C und Decorin exprimiert sowie in den Wachstumsfaktorengruppen mehr GAPDH, als in der Ausgangskontrolle. Es kann eine leichte Steigerung der Osteocalcin- und Kollagen Typ II Synthese auf sehr niedrigem Niveau beobachtet werden.

6. Diskussion

6.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Das Ziel im Tendon Tissue Engineering ist es in vitro Gewebe zu erzeugen, das zum Sehnenersatz, zur Sehnenheilung oder beziehungsweise Sehnenverbesserung geeignet ist. Ein besonders komplexer wie entscheidender Schritt ist die Differenzierung von Zellen hin zu Tenozyten. Zum ersten Mal wurden in dieser Studie humane dermale Fibroblasten mit IGF-1, PDGF-BB, FGF sowie zusätzlich BMP-13 stimuliert um Sehnenzellen zu erhalten mit dem Ergebnis, dass sie signifikant stärker Proliferieren als die Kontrolle, histologisch mehr Zellverknüpfungen haben, tenozytenartig aussehen und nicht dedifferenzieren.

Anhand der morphologischen Auswertung der Studienbilder konnte in der Studie gezeigt werden, dass die Fibroblasten in den beiden mit Wachstumsfaktoren versetzten Gruppen deutlich mehr Zell-Zellkontakte besitzen und dass die Zellaktivität mit mehr intrazellulären Vesikeln höher ist. Ebenso zeigten sich die Fibroblasten langgestreckter sowie dünner, was das Erscheinungsbild von Tenozyten erahnen lässt.

Bezüglich der Zellzahl lag Gruppe 1 mit IGF-1, PDGF-BB und FGF stets niedriger als Gruppe 2, welche zusätzlich BMP-13 erhielt. Die Kontrollgruppe hatte die niedrigste Anzahl an Zellen. An Tag 3 und Tag 7 bestand eine signifikante Überlegenheit von G2 zur Kontrolle, im Gegensatz zu G1, die der Kontrolle nie signifikant überlegen war.

Hinsichtlich der Proliferationsmessung im WST-1 Versuch waren beide Wachstumsfaktorengruppen der Kontrolle signifikant überlegen und zeigten damit einen stärkeren Anstieg der Zellzahl in den Wells. G2 war aber bereits an Tag 1 und 3 der Kontrolle überlegen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der hohe Nachweis der Sehnenproteine Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Tenascin C und Decorin, wobei sich an den Messpunkten Tag 3, Tag 7 und Tag 10 für die Gruppen G1, G2 und K kaum unterschieden und es wenig Veränderung zu den Ausgangszellen gab. Die Expression von Osteocalcin und Kollagen Typ II war sehr niedrig. Scleraxis und Tenomodulin konnten sowohl qualitativ, als auch quantitativ nicht nachgewiesen werden.

6.2. Diskussion der Methoden

Ein zentraler Punkt ist die Verwendung humaner dermalen Fibroblasten, welche undifferenzierte Tenozyten sind (38). Costa et al. (54) verwendeten für ihre Versuche Tenozyten von Kaninchen. Bei Tierversuchen ist die Donormorbidität in geringerem Maße zu berücksichtigen, als beim Menschen, dem beispielsweise beim autologen Kreuzbandersatz Sehnen entnommen werden (43). Der Vorteil von Tenozyten ist selbstverständlich die bereits abgeschlossene Differenzierung, welche Fibroblasten noch durchlaufen müssen. Im Gegensatz dazu steht die einfache Verfügbarkeit von dermalen Fibroblasten, bei sehr geringer Beeinträchtigung des Organismus bei der Spende beziehungsweise Entnahme. MSC und ADSC sind weitere verwendete Zellarten, wobei MSC aus dem Knochenmark kommen und somit in geringer Zahl vorhanden sind und ADSC leichter zu gewinnen sind, aber bei beiden Stammzellderivaten müsste noch die komplette Differenzierung zu Tenozyten erfolgen (45-48).

In einer weiteren Studie am Kaninchen wurden Fibroblasten, Tenozyten, MSC und ADSC miteinander verglichen beim Besiedeln eines Sehnendefekts und der anschließenden Replantation in lebende Kaninchen zeigten alle Gruppen eine gleich ausgeprägte Kollagensynthese, nur ADSC waren bei der Zellproliferation den Tenozyten überlegen (72). Somit ist die Verwendung von humanen Fibroblasten realitätsnäher und bereits näher an der praktischen Zielsetzung für den klinischen Einsatz.

Zusätzlich muss man anmerken, dass in den Durchläufen Zellen der 6. Passage, 7. Passage und 9. Passage verwendet wurden. Möglichst niedrige Passagen sind noch besser geeignet, da mit höherer Passage die Kollagenase Produktion ansteigt (73).

6.3. Diskussion der Ergebnisse

Zunächst konnte man bildmorphologisch erhebliche Unterschiede zwischen der Kontrolle und den beiden Wachstumsfaktorengruppen erkennen. Deren Einfluss bewirkt anscheinend eine deutlich höhere Zellaktivität, was an den zahlreichen Vesikeln in G1 und G2 zu sehen war, ebenso wie eine stärkere Zellinteraktion was sich durch die vielen Zell-Zell-Kontakte äußerte und eine andere Zellform. In den gehäuften Vesikeln könnten Proteine für eine EZM sein. Die längsgestreckte Zellstruktur und dicht gepackten Zellen ähneln der Struktur einer Sehne und sprechen dafür, dass die Wachstumsfaktoren die Zellen in Richtung Tenozyten gebracht haben könnten. Dafür sprechen ebenfalls die Studienergebnisse die zeigen, dass sich ein tenozytenartiger Phänotyp der Fibroblasten einstellt, wenn humane dermale Fibroblasten mit einer hohen Dichte kultiviert werden (74).

Generell kann man aus dem Nachweis von einer hohen Expression der typischen Sehnenproteine Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Tenascin C und Decorin schließen, dass humane dermale Fibroblasten für das Tissue Engineering von Sehnen geeignet sind. Li et al. konnte für Kollagen Typ I in Fibroblasten sogar erhöhte Werte bei einer langgestreckten tenozytenartigen Form nachweisen (75).

Insgesamt konnte im WST-1 Test und hinsichtlich der Zellzahl signifikant ein schnelleres Zellwachstum, eine häufigere Zellteilung und damit eine höhere Zellzahl durch IGF-1, PDGF-BB und FGF für die humanen dermalen Fibroblasten ab Tag 7 gezeigt werden, was sich mit den Ergebnissen für diese Wachstumsfaktoren bei Verwendung für Tenozyten von Kaninchen von Costa et al. (54) deckt. Ein signifikanter additiver Aspekt bezüglich der Proliferation durch BMP-13 zeigte sich hinsichtlich der Zellzahl an Tag 3 und 7 sowie bei der Extinktion an Tag 1 und Tag 3, indem Gruppe 2 mit BMP-13 im Gegensatz zur Gruppe 1, jeweils eine signifikant höhere Zellproliferation als die Kontrolle hatte. BMP-13 steigerte besonders am Anfang das Wachstum zusätzlich, wobei die fehlende Signifikanz an Tag 10 auf die Kontaktinhibierung des Wachstums in den Zellkulturflaschen und Wells aus Platzgründen zurückgeführt werden sollte. Wong et al. beobachtete isoliert für BMP-13 bei humanen Tenozyten eine verstärkte Zellproliferation (57).

Die Light-Cycler Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Zellen ihr Differenzierungsniveau halten und dass sich dieses nicht maßgeblich durch die zusätzlichen Wachstumsfaktoren ändert. Die Synthese von sehnentypischen Proteinen wurde nicht signifikant gesteigert. In der Literatur zeigte sich für IGF-1, dass es in

humanen Tenozyten zu einer vermehrten Kollagen Typ I Synthese und höheren Expressionen von Tenomodulin und Scleraxis führen kann (76). In unseren Versuchen konnten Tenomodulin und Scleraxis beide nicht nachgewiesen werden, was nicht im Widerspruch zur Literatur steht, weil andere Studien zeigten, dass Scleraxis und Tenomodulin stark voneinander abhängig sind (77). Im Gegensatz zur durchgeführten Studie konnte Wong et al. durch BMP-13 in Tenozyten eine erhöhte Kollagensynthese zeigen (57). Ein Grund könnte in dem bereits beschriebenen geringen Unterschied zwischen Fibroblasten und Tenozyten liegen.

Insgesamt betrachtet, zeigt sich, dass keine Dedifferenzierung der Fibroblasten erfolgt, was für eine Eignung im TTE spricht. Wie zu erwarten entwickelte sich keine Osteogenese zu Knochen oder Chondrogenese zu Knorpel der Fibroblasten unter den Wachstumsfaktoren, was sich mit den bisherigen publizierten Studien deckt.

6.4. Einordnung in die Literatur

Besonders entscheidend für die Bewertung einer Studie ist der Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den bisher publizierten Studien. Dale et al. (78) stimulierte humane MSC mit BMP-12 und wie in der hier vorliegenden Studie mit BMP-13 unter Zusatz von Ascorbin Säure. Es wurde bei Blockade des TGF- β Signalwegs gezeigt, dass MSC unter Stimulation mit BMP-12 und BMP-13 eine ähnliche Expression von Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Decorin, Tenascin C und Tenomodulin wie Kontrolltenozyten haben. In unserer Studie konnten wir bei den Fibroblasten ebenso Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Decorin und Tenascin C nachweisen, was für eine ähnliche Qualität und Eignung der Fibroblasten spricht.

In ihrer Studie zeigten Bottagisio et al. (79), dass MSC aus dem Knochenmark von Kaninchen auf 3D-Fibrin Gerüsten unter Kombination von BMP-12, BMP-14, VEGF und TGF- β eine tenozytenartige Differenzierung entwickeln. Insbesondere die Expression bei Kollagen Typ I mit $p < 0,01$ und Kollagen Typ III mit $p < 0,05$ war im Vergleich zur Kontrolle ohne Gerüst und ohne Wachstumsfaktoren deutlich erhöht. In unseren Versuchen verwendeten wir andere Wachstumsfaktoren und kein 3D-Fibrin Gerüst. In unserer Monolayer-Kultur, ohne Einflüsse durch das Konstrukt, blieb die Differenzierung den Fibroblasten insbesondere hinsichtlich Kollagen Typ I und Kollagen Typ III konstant, wobei Fibroblasten grundsätzlich ein höheres Kollagenniveau aufweisen als MSC.

Besonders hervorzuheben ist der Ansatz von Testa et al in ihrer Studie (80), die murine Fibroblasten mit TGF und Ascorbinsäure auf einer 3D-Fibrogenmatrix mit zyklischem Zug behandelten. Sie verwendeten ebenso, wie unsere Forschungsgruppe Fibroblasten, hingegen kam mit TGF- β ein anderer Wachstumsfaktor zum Einsatz. Sie verglichen die Genexpression von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III. Signifikanz bei Kollagen I mit $p < 0,001$ bestand für eine 3D-Kultur mit zyklischem Zug verglichen mit einer 2D-Kultur und mit $p < 0,01$ gegen eine 3D-Kultur mit statischem Zug. Hinsichtlich Kollagen Typ III hatte die 3D-Kultur unter zyklischem Zug signifikant ($p < 0,01$) mehr mRNA als die 2D-Kultur. Bezüglich der Elastizität zeigten sich keine Signifikanzen, ebenso wenig wie zwischen den Gruppen mit Wachstumsfaktor und ohne.

6.5. Limitationen der Studie

Wie jede wissenschaftliche Untersuchung hat auch diese Studie ihre Grenzen. Von den zahlreichen verschiedenen Wachstumsfaktoren, die an der Tenogenese beteiligt sind, wie bereits ausgeführt, konzentrierte sich unsere Arbeitsgruppe auf BMP-13, IGF-1, FGF und PDGF-BB. Einflüsse von VEGF, TGF- β und zahlreichen weiteren möglicherweise bedeutenden Faktoren konnten bei der Fokussierung auf die Wirkung der verwendeten Faktoren auf humane Fibroblasten nicht in dieser Studie umgesetzt werden und würden den Rahmen dieser Arbeit überschreiten. In Zukunft sollten diese Fragestellungen in weiteren Experimenten geklärt werden.

Das natürliche Umfeld der Sehne und der Tenozyten wird durch eine 3D-Kultur besser dargestellt als durch die 2D-Kultur und es konnten schon hinsichtlich der Tenogenese positive Ergebnisse in 3D-Kulturen mit Fibrinnetzen und anderen strukturgebenden Gerüsten publiziert werden (79, 80). Diese Art von Strukturen wäre aber ebenfalls eine zusätzliche Variable, die den Schwerpunkt weg von der Kernfrage, bezüglich der Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die Fibroblasten, führen könnte. Ein positiv multiplikatorischer Effekt durch das Gerüst hätte jedoch auftreten können.

Wünschenswert wäre die Möglichkeit der zyklischen biomechanischen Zugbelastung einer 3D-Struktur in einem Bioreaktor gewesen, wie etwa durch Angelidis et al. (81), die Fibroblasten auf avitalisierte Flexorensehn gaben und dadurch die Reißfestigkeit und Elastizität der Sehne steigerten. Leider zeigen sich in Bioreaktorversuchen häufig Probleme der Sterilität. Ein derartiger Versuchsaufbau mit der durchgeführten Wachstumsfaktorstimulation hätte die Ressourcen unseres Projektes bei weitem übertroffen.

6.6. Ausblick

Insbesondere an der Rotatorenmanschette werden Materialien benötigt, um große Defekte zu überbrücken, bei einer schlechten Ausgangsqualität der Sehne. Speziell die degenerative Ätiologie der meisten Rotatorenmanschettenrupturen und das hohe Alter der Patienten wirken sich negativ auf das Heilungspotential der Sehnen aus, wie oben bereits ausführlich erwähnt. In dieser Situation könnte es ein enormer Vorteil sein, Fremdmaterial, beziehungsweise aus körpereigenen Zellen des Patienten gezüchtetes Ersatzmaterial mit vitalen Zellen, zur Überbrückung eines großen Defekts intraoperativ zu verwenden. Diese Material sollte nicht nur den Riss der Sehne verschließen, ohne beispielsweise Fadenanker unter höchster Spannung zu setzen, sondern auch ein hohes Regenerationspotential besitzen, damit die Sehne wieder selbst ihr Kollagen- und Sehnenproteinmuster über den alten Defekt hinweg produzieren kann, sodass dadurch die Reißfestigkeit und Elastizität wiederhergestellt werden können.

Bisher ist noch nicht abschließend geklärt welche die beste Zelllinie für das TTE ist. Die parallele Verwendung von MSC, ADSC, Tenozyten und Fibroblasten durch unterschiedliche Forschungslabore weltweit verdeutlicht dies. Unsere Arbeitsgruppe beschäftigte sich bereits ausgiebig mit der Gewinnung von Tenozyten und konnte nachweisen, dass die enzymatische Verdauung von Sehnen eine sehr wirkungsvolle Methode zur Isolation von Tenozyten ist (82), dabei aber keine sehr große Zahl an Tenozyten zu erhalten ist.

Für die Züchtung von künstlichem vitalen Gewebe im Labor, das anschließend replantiert werden soll, ist eine Immunkompatibilität notwendig, welche durch Verwendung von Zellen des Empfängers erreicht wird. Besonders in dieser Hinsicht sind dermale Fibroblasten hochattraktiv aufgrund ihrer geringen Donormorbidität. Die Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigen klar, dass die benutzten dermalen Fibroblasten zentrale Eigenschaften für das TTE, wie die Kollagensynthese, besitzen. Aus diesen Gründen ist zu erwarten, dass die Bedeutung von humanen dermalen Fibroblasten, je näher das TTE dem klinischen Einsatz kommt, zunimmt.

Hinsichtlich Wachstumsfaktoren ist davon auszugehen, dass diese weiterhin verwendet werden im TTE, weil diese zu einer schnelleren Zellproliferation führen. Dieser Sachverhalt konnte in der Arbeit für IGF-1, FGF, PDGF-BB und BMP-13 gezeigt werden. Damit können sie die Zeit verkürzen, um ein vitales Material zum Sehnenersatz herzustellen und ermöglichen es, dies mit niedrigen Ausgangszellzahlen zu

bewerkstelligen. Hierbei tritt ein erheblicher Vorteil hervor, weil dadurch weniger Zellen aus dem Körper des Patienten gewonnen werden müssen. Die unterschiedlichen positiven Auswirkungen hin zu einer sehnähnlichen Proteinsynthese der Wachstumsfaktoren, welche für IGF-1 und BMP-13 gezeigt wurden (57, 76) , müssen kombiniert werden, wie in der Studie geschehen mit dem Zusammenspiel von IGF-1, FGF, PDGF-BB und BMP-13, um die optimalen Konzentrationen und synergistische Effekte für die Tenogenese herauszufinden. Das Verständnis um die Embryogenese von Sehnen und die Beteiligung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Nerve Growth Factor (NGF) (83) und den Einfluss der verschiedenen Wachstumsfaktoren sollte in Zukunft bei der Weiterentwicklung des TTE helfen.

Zahlreiche weitere Studien demonstrieren, dass biomechanische Stimuli sich positiv auf die Sehnenentwicklung auswirken. Dazu müssen die Zellen auf ein Trägermaterial aufgetragen werden. Dies bedeutet eine zelluläre Augmentation von neuartigen Scaffoldmaterialien, die biologischen oder synthetischen Ursprungs sein können. Joshi et al. konnte für Fibroblasten (84) auf Polyurethan Scaffolds beweisen, dass diese unter zyklischem Zug eine höhere Elastizität entwickeln. Ebenso konnte unsere Arbeitsgruppe an Achillessehnendefekten von Ratten zeigen, dass mit Tenozyten auf Scaffolds die höchste Zugfestigkeit erreicht werden kann im Vergleich zu Mesenchymalen Stammzellen oder Scaffolds ohne zelluläre Augmentation (85).

In den USA wird vor allem der Einsatz von Allografts besonders am Knie immer bedeutender. Metaanalysen konnten bereits zeigen, dass bei Kreuzbändern Allografts den Autografts nicht unterlegen sind (86). Woon et al (47) gab Adipose-derived stem cells (ADSC) als Augmentation über Allografts für 14 Tage in Zellkultur. Im Ultimate tensile stress (UTS) ($p=0,002$) und elastic Modulus (EM) ($p=0,04$) waren sie besser als die Kontrolle und die Histologie zeigt ein Erscheinungsbild von nativen Tenozyten. Bei Angelidis et al. erfolgte ein Zusammenspiel aus mechanischem Stimulus, zellulärer Augmentation und Allograft, indem Flexorensehnen mit ADSC oder Fibroblasten überwachsen und cyclischem Zug für fünf Tage im Bioreaktor ausgesetzt wurden (81). UTS und EM bei Fibroblasten und ADSC waren jeweils mit Zug besser ($p<0,001$) als Kontrollen ohne Zug, wobei sich kein Unterschied zwischen ADSC und Fibroblasten zeigte.

Insgesamt lässt sich erkennen, dass die Entwicklung und Entstehung von Sehnen ein sehr komplexes und multifaktorielles Geschehen ist. Dieses muss wohl am ehesten durch eine Kombination aus geeigneten Zellen, der passenden Konzentration an

Wachstumsfaktoren, biomechanischer Belastung und optimaler extrazellulärer Trägersubstanz bewerkstelligt werden um zum Erfolg zu gelangen.

7. Zusammenfassung

Sehnenverletzungen zählen in Deutschland und weltweit zu den häufigsten Erkrankungen des Bewegungsapparats (2). Besonders degenerative Defekte lassen sich häufig nur schwer therapeutisch beheben, da diese faserigen Sehnen eine schlechte Qualität aufweisen, welche sich negativ auf das Outcome auswirkt und aktuell keine optimalen Sehnenersatzmaterialien, insbesondere für die Rotatorenmanschette, verfügbar sind. Hauptziel des Tendon Tissue Engineering ist es Substrate zu entwickeln, die natürliche Gewebe ersetzen oder verbessern können, damit diese wieder ihre originären Aufgaben im Körper erfüllen können. Die Fragestellung der Arbeit war, ob humane dermale Fibroblasten mit Stimulation durch IGF-1, PDGF-BB, FGF und BMP-13 schneller proliferieren und sich in Richtung Tenozyten differenzieren.

Fibroblasten wurden mit BMP-13 in der Konzentration 25ng/ml, IGF in der Konzentration 100ng/ml, PDGF-BB (50ng/ml) und FGF (5ng/ml) in Zellkultur und im WST-1 Versuch stimuliert und mit zwei Gruppen, von denen eine kein BMP-13 erhielt sowie einer Kontrolle ohne Wachstumsfaktoren verglichen. Für den Nachweis wurden die Zellzahl der Zellkulturflaschen, die Extinktion im WST-1 Test, die C_t -Werte im LightCycler mit Hilfe von PCR und die cDNA nach PCR in der Gelelektrophorese ermittelt.

Durch die zusätzliche Gabe von BMP-13 zu IGF, PDGF-BB und FGF fällt bereits nach einem Tag, sowie drei Tagen die Zellproliferation im WST-1 signifikant besser aus als die Kontrolle (jeweils $p < 0,001$). Erst an Tag 7 und 10 kann die Gruppe ohne BMP-13 ebenso eine signifikante Überlegenheit wie mit BMP-13 gegenüber der Kontrolle herstellen, wobei die BMP-13 Gruppe in den Wells bereits zu diesem Zeitpunkt an die Grenze des möglichen Wachstums stößt.

In der Zellkultur zeigt sich das gleiche Bild. Dabei kam es durch die zusätzliche Stimulation mit BMP-13 zu einer signifikanten Überlegenheit im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Stimulation an Tag drei und sieben mit $p = 0,02$ und $p = 0,041$. Mikroskopisch unterschied sich die Gestalt der Fibroblasten zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen der Gruppe mit BMP-13 Stimulation waren langgestreckter und tenozytenartiger mit mehr Zell-Zell-Kontakten und intrazellulären Vesikeln als die Gruppe ohne BMP-13 bzw. die Kontrollgruppe.

Im LightCycler konnten hohe Werte an mRNA der Sehnenmarker Kollagen Typ I und 3, Tenascin-C sowie Decorin nachgewiesen werden, wobei sich die Gruppen hinsichtlich der Genexpression keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Bezüglich der tenogenen Marker Tenascin C, Kollagen Typ I und 3 kam es zu einem starken Anstieg der Ratios im Vergleich zum Ausgangswert. Eine Dedifferenzierung hin zu Knochen oder Knorpel mit einer relevanten Veränderung der Genexpression bezüglich der Fibroblasten trat nicht auf.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren eine Zellzahl- und Proliferationssteigerung ohne Dedifferenzierung stattfindet. Dabei ist ein klarer additiver Effekt von BMP-13 als Zusatz zu IGF, FGF und PDGF-BB erzielt worden, der zu einer schnelleren Proliferation und früheren Signifikanz in den Versuchen führt. In Zukunft können diese beiden Erkenntnisse wichtige Elemente im TTE werden, wenn sie im Zusammenspiel mit biomechanischen Stimuli auf extrazellulären Trägersubstanzen verwendet werden.

8. Literaturverzeichnis

1. Liu CF, Aschbacher-Smith L, Barthelery NJ, Dymment N, Butler D, Wylie C. What we should know before using tissue engineering techniques to repair injured tendons: a developmental biology perspective. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2011;17(3):165-76.
2. Clayton RA, Court-Brown CM. The epidemiology of musculoskeletal tendinous and ligamentous injuries. *Injury*. 2008;39(12):1338-44.
3. Wurzingler LJ, Aumüller G. *Duale Reihe Anatomie*. Thieme; 2010.
4. Karduna AR, Williams GR, Williams JL, Iannotti JP. Kinematics of the glenohumeral joint: influences of muscle forces, ligamentous constraints, and articular geometry. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 1996;14(6):986-93.
5. Rodosky MW, Harner CD, Fu FH. The role of the long head of the biceps muscle and superior glenoid labrum in anterior stability of the shoulder. *The American journal of sports medicine*. 1994;22(1):121-30.
6. Pagnani MJ, Deng XH, Warren RF, Torzilli PA, O'Brien SJ. Role of the long head of the biceps brachii in glenohumeral stability: a biomechanical study in cadavera. *J Shoulder Elbow Surg*. 1996;5(4):255-62.
7. Gilot GJ, Attia AK, Alvarez AM. Arthroscopic repair of rotator cuff tears using extracellular matrix graft. *Arthrosc Tech*. 2014;3(4):e487-9.
8. Ogata S, Uhthoff HK. Acromial enthesopathy and rotator cuff tear. A radiologic and histologic postmortem investigation of the coracoacromial arch. *Clin Orthop Relat Res*. 1990(254):39-48.
9. Hawkins RJ, Morin WD, Bonutti PM. Surgical treatment of full-thickness rotator cuff tears in patients 40 years of age or younger. *J Shoulder Elbow Surg*. 1999;8(3):259-65.
10. Neer CS, 2nd. Impingement lesions. *Clin Orthop Relat Res*. 1983(173):70-7.
11. Neer CS, 2nd. Anterior acromioplasty for the chronic impingement syndrome in the shoulder: a preliminary report. *J Bone Joint Surg Am*. 1972;54(1):41-50.
12. Lohr JF, Uhthoff HK. [Epidemiology and pathophysiology of rotator cuff tears]. *Orthopade*. 2007;36(9):788-95.
13. Henseler JF, de Witte PB, de Groot JH, van Zwet EW, Nelissen RG, Nagels J. Cranial translation of the humeral head on radiographs in rotator cuff tear patients: the modified active abduction view. *Med Biol Eng Comput*. 2014;52(3):233-40.
14. Uhthoff HK, Sano H. Pathology of failure of the rotator cuff tendon. *Orthop Clin North Am*. 1997;28(1):31-41.
15. Gumina S, Di Giorgio G, Bertino A, Della Rocca C, Sardella B, Postacchini F. Inflammatory infiltrate of the edges of a torn rotator cuff. *Int Orthop*. 2006;30(5):371-4.
16. Cadet ER, Adler RS, Gallo RA, Gamradt SC, Warren RF, Cordasco FA, et al. Contrast-enhanced ultrasound characterization of the vascularity of the repaired rotator cuff tendon: short-term and intermediate-term follow-up. *J Shoulder Elbow Surg*. 2012;21(5):597-603.
17. Mora MV, Iban MA, Heredia JD, Laakso RB, Cuellar R, Arranz MG. Stem cell therapy in the management of shoulder rotator cuff disorders. *World J Stem Cells*. 2015;7(4):691-9.
18. Sharma P, Maffulli N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006;6(2):181-90.
19. Manske PR, Gelberman RH, Lesker PA. Flexor tendon healing. *Hand Clin*. 1985;1(1):25-34.

20. Fujita M, Hukuda S, Doida Y. [Experimental study of intrinsic healing of the flexor tendon: collagen synthesis of the cultured flexor tendon cells of the canine]. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. 1992;66(4):326-33.
21. Ingraham JM, Hauck RM, Ehrlich HP. Is the tendon embryogenesis process resurrected during tendon healing? *Plast Reconstr Surg*. 2003;112(3):844-54.
22. Koob TJ. Biomimetic approaches to tendon repair. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2002;133(4):1171-92.
23. Docheva D, Muller SA, Majewski M, Evans CH. Biologics for tendon repair. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;84:222-39.
24. Adebajo AO, Nash P, Hazleman BL. A prospective double blind dummy placebo controlled study comparing triamcinolone hexacetonide injection with oral diclofenac 50 mg TDS in patients with rotator cuff tendinitis. *J Rheumatol*. 1990;17(9):1207-10.
25. Hawkins RH, Dunlop R. Nonoperative treatment of rotator cuff tears. *Clin Orthop Relat Res*. 1995(321):178-88.
26. Ainsworth R. Physiotherapy rehabilitation in patients with massive, irreparable rotator cuff tears. *Musculoskeletal Care*. 2006;4(3):140-51.
27. Collin PG, Gain S, Nguyen Huu F, Ladermann A. Is rehabilitation effective in massive rotator cuff tears? *Orthop Traumatol Surg Res*. 2015;101(4 Suppl):S203-5.
28. Ekeberg OM, Bautz-Holter E, Tveita EK, Juel NG, Kvalheim S, Brox JI. Subacromial ultrasound guided or systemic steroid injection for rotator cuff disease: randomised double blind study. *BMJ*. 2009;338:a3112.
29. Le BT, Wu XL, Lam PH, Murrell GA. Factors predicting rotator cuff retears: an analysis of 1000 consecutive rotator cuff repairs. *The American journal of sports medicine*. 2014;42(5):1134-42.
30. Hak A, Rajaratnam K, Ayeni OR, Moro J, Peterson D, Sprague S, et al. A Double-Blinded Placebo Randomized Controlled Trial Evaluating Short-term Efficacy of Platelet-Rich Plasma in Reducing Postoperative Pain After Arthroscopic Rotator Cuff Repair: A Pilot Study. *Sports health*. 2015;7(1):58-66.
31. Asfaha S, Cenac N, Houle S, Altier C, Papez MD, Nguyen C, et al. Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation. *British journal of pharmacology*. 2007;150(2):176-85.
32. Ficklscherer A, Pietschmann MF, Bendiks M, Rossbach BP, Muller PE. [Clinical management of rotator cuff tears. Current concepts in cell-based therapy strategies]. *Orthopade*. 2016;45(2):143-8.
33. Warth RJ, Dornan GJ, James EW, Horan MP, Millett PJ. Clinical and Structural Outcomes After Arthroscopic Repair of Full-Thickness Rotator Cuff Tears With and Without Platelet-Rich Product Supplementation: A Meta-analysis and Meta-regression. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 2015;31(2):306-20.
34. Barber FA, Burns JP, Deutsch A, Labbe MR, Litchfield RB. A prospective, randomized evaluation of acellular human dermal matrix augmentation for arthroscopic rotator cuff repair. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 2012;28(1):8-15.
35. Wang AW, Bauer S, Goonatillake M, Breidahl W, Zheng MH. Autologous tenocyte implantation, a novel treatment for partial-thickness rotator cuff tear and tendinopathy in an elite athlete. *BMJ case reports*. 2013;2013.
36. Silver FH, Freeman JW, Seehra GP. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech*. 2003;36(10):1529-53.

37. Galloway MT, Lalley AL, Shearn JT. The Role of Mechanical Loading in Tendon Development, Maintenance, Injury, and Repair2013 2013-09-04 00:00:00. 1620-8 p.
38. Welsch U, Deller T, Kummer W. Lehrbuch Histologie. Elsevier, Urban & Fischer; 2014.
39. Docheva D, Hunziker EB, Fassler R, Brandau O. Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(2):699-705.
40. O'Brien M. Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sports*. 1997;7(2):55-61.
41. Kannus P, Jozsa L, Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kvist M, Natri A, et al. Location and distribution of non-collagenous matrix proteins in musculoskeletal tissues of rat. *Histochem J*. 1998;30(11):799-810.
42. Mackie EJ, Ramsey S. Expression of tenascin in joint-associated tissues during development and postnatal growth. *J Anat*. 1996;188 (Pt 1):157-65.
43. Cvetanovich GL, Mascarenhas R, Saccomanno MF, Verma NN, Cole BJ, Bush-Joseph CA, et al. Hamstring autograft versus soft-tissue allograft in anterior cruciate ligament reconstruction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 2014;30(12):1616-24.
44. Yao L, Bestwick CS, Bestwick LA, Maffulli N, Aspden RM. Phenotypic drift in human tenocyte culture. *Tissue engineering*. 2006;12(7):1843-9.
45. Petrou IG, Grognez A, Hirt-Burri N, Raffoul W, Applegate LA. Cell therapies for tendons: old cell choice for modern innovation. *Swiss medical weekly*. 2014;144:w13989.
46. Dhinsa BS, Mahapatra AN, Khan WS. Sources of adult mesenchymal stem cells for ligament and tendon tissue engineering. *Current stem cell research & therapy*. 2014;10(1):26-30.
47. Woon CY, Farnebo S, Schmitt T, Kraus A, Megerle K, Pham H, et al. Human flexor tendon tissue engineering: revitalization of biostatic allograft scaffolds. *Tissue engineering Part A*. 2012;18(23-24):2406-17.
48. Uysal AC, Mizuno H. Tendon regeneration and repair with adipose derived stem cells. *Current stem cell research & therapy*. 2010;5(2):161-7.
49. Tang QM, Chen JL, Shen WL, Yin Z, Liu HH, Fang Z, et al. Fetal and adult fibroblasts display intrinsic differences in tendon tissue engineering and regeneration. *Scientific reports*. 2014;4:5515.
50. Deng D, Liu W, Xu F, Yang Y, Zhou G, Zhang WJ, et al. Engineering human neo-tendon tissue in vitro with human dermal fibroblasts under static mechanical strain. *Biomaterials*. 2009;30(35):6724-30.
51. Abousleiman RI, Reyes Y, McFetridge P, Sikavitsas V. Tendon tissue engineering using cell-seeded umbilical veins cultured in a mechanical stimulator. *Tissue engineering Part A*. 2009;15(4):787-95.
52. Murchison ND, Price BA, Conner DA, Keene DR, Olson EN, Tabin CJ, et al. Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. *Development (Cambridge, England)*. 2007;134(14):2697-708.
53. Youngstrom DW, Rajpar I, Kaplan DL, Barrett JG. A bioreactor system for in vitro tendon differentiation and tendon tissue engineering. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2015;33(6):911-8.

54. Costa MA, Wu C, Pham BV, Chong AK, Pham HM, Chang J. Tissue engineering of flexor tendons: optimization of tenocyte proliferation using growth factor supplementation. *Tissue engineering*. 2006;12(7):1937-43.
55. Cummings SH, Grande DA, Hee CK, Kestler HK, Roden CM, Shah NV, et al. Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB-coated sutures on Achilles tendon healing in a rat model: A histological and biomechanical study. *Journal of tissue engineering*. 2012;3(1).
56. Caliari SR, Harley BA. The effect of anisotropic collagen-GAG scaffolds and growth factor supplementation on tendon cell recruitment, alignment, and metabolic activity. *Biomaterials*. 2011;32(23):5330-40.
57. Wong YP, Fu SC, Cheuk YC, Lee KM, Wong MW, Chan KM. Bone morphogenetic protein 13 stimulates cell proliferation and production of collagen in human patellar tendon fibroblasts. *Acta orthopaedica*. 2005;76(3):421-7.
58. Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(2):321-30.
59. Helm GA, Li JZ, Alden TD, Hudson SB, Beres EJ, Cunningham M, et al. A light and electron microscopic study of ectopic tendon and ligament formation induced by bone morphogenetic protein-13 adenoviral gene therapy. *Journal of neurosurgery*. 2001;95(2):298-307.
60. Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science (New York, NY)*. 1991;254(5035):1146-53.
61. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts JCT. Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. *Endocrine Reviews*. 1995;16(2):143-63.
62. Tentori L, Graziani G. Doping with growth hormone/IGF-1, anabolic steroids or erythropoietin: is there a cancer risk? *Pharmacological research*. 2007;55(5):359-69.
63. Hannink M, Donoghue DJ. Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1989;989(1):1-10.
64. Battegay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage EH, Pech M. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *The Journal of Cell Biology*. 1994;125(4):917.
65. Ide J, Kikukawa K, Hirose J, Iyama K-i, Sakamoto H, Fujimoto T, et al. The effect of a local application of fibroblast growth factor-2 on tendon-to-bone remodeling in rats with acute injury and repair of the supraspinatus tendon. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. 2009;18(3):391-8.
66. Shen B, Bhargav D, Wei A, Williams LA, Tao H, Ma DDF, et al. BMP-13 Emerges as a Potential Inhibitor of Bone Formation. *International Journal of Biological Sciences*. 2009;5(2):192-200.
67. Forslund C, Rueger D, Aspenberg P. A comparative dose-response study of cartilage-derived morphogenetic protein (CDMP)-1, -2 and -3 for tendon healing in rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2003;21(4):617-21.
68. Wagenhäuser M. Untersuchung und Charakterisierung unterschiedlicher Tenozyten und vergleichende Prüfung der Biofunktionalität und Biomechanik eines Polyester- und eines Kollagenzellträgers [Dissertation, LMU München]2012.
69. Hamalainen HK, Tubman JC, Vikman S, Kyrola T, Ylikoski E, Warrington JA, et al. Identification and validation of endogenous reference genes for expression

- profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. *Analytical biochemistry*. 2001;299(1):63-70.
70. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (San Diego, Calif). 2001;25(4):402-8.
 71. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics*. 2005;21(3):389-95.
 72. Kryger GS, Chong AK, Costa M, Pham H, Bates SJ, Chang J. A comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells for use in flexor tendon tissue engineering. *The Journal of hand surgery*. 2007;32(5):597-605.
 73. Millis AJ, Sottile J, Hoyle M, Mann DM, Diemer V. Collagenase production by early and late passage cultures of human fibroblasts. *Experimental gerontology*. 1989;24(5-6):559-75.
 74. Wang W, He A, Zhang Z, Zhang W, Zhou G, Cao Y, et al. Induction of transient tenogenic phenotype of high-density cultured human dermal fibroblasts. *Connective tissue research*. 2015;56(4):288-99.
 75. Li F, Li B, Wang QM, Wang JH. Cell shape regulates collagen type I expression in human tendon fibroblasts. *Cell motility and the cytoskeleton*. 2008;65(4):332-41.
 76. Herchenhan A, Bayer ML, Eliasson P, Magnusson SP, Kjaer M. Insulin-like growth factor I enhances collagen synthesis in engineered human tendon tissue. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 2015;25(1):13-9.
 77. Shukunami C, Takimoto A, Oro M, Hiraki Y. Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Developmental biology*. 2006;298(1):234-47.
 78. Dale TP, Mazher S, Webb WR, Zhou J, Maffulli N, Chen GQ, et al. Tenogenic differentiation of human embryonic stem cells. *Tissue engineering Part A*. 2017.
 79. Bottagisio M, Lopa S, Granata V, Talo G, Bazzocchi C, Moretti M, et al. Different combinations of growth factors for the tenogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in monolayer culture and in fibrin-based three-dimensional constructs. *Differentiation; research in biological diversity*. 2017;95:44-53.
 80. Testa S, Costantini M, Fornetti E, Bernardini S, Trombetta M, Seliktar D, et al. Combination of biochemical and mechanical cues for tendon tissue engineering. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2017.
 81. Angelidis IK, Thorfinn J, Connolly ID, Lindsey D, Pham HM, Chang J. Tissue engineering of flexor tendons: the effect of a tissue bioreactor on adipoderived stem cell-seeded and fibroblast-seeded tendon constructs. *The Journal of hand surgery*. 2010;35(9):1466-72.
 82. Wagenhauser MU, Pietschmann MF, Sievers B, Docheva D, Schieker M, Jansson V, et al. Collagen type I and decorin expression in tenocytes depend on the cell isolation method. *BMC musculoskeletal disorders*. 2012;13:140.
 83. Russo V, Mauro A, Martelli A, Di Giacinto O, Di Marcantonio L, Nardinocchi D, et al. Cellular and molecular maturation in fetal and adult ovine calcaneal tendons. *J Anat*. 2015;226(2):126-42.
 84. Joshi SD, Webb K. Variation of cyclic strain parameters regulates development of elastic modulus in fibroblast/substrate constructs. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2008;26(8):1105-13.
 85. Pietschmann MF, Frankewycz B, Schmitz P, Docheva D, Sievers B, Jansson V, et al. Comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells seeded on biodegradable

scaffolds in a full-size tendon defect model. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2013;24(1):211-20.

86. Mascarenhas R, Erickson BJ, Sayegh ET, Verma NN, Cole BJ, Bush-Joseph C, et al. Is there a higher failure rate of allografts compared with autografts in anterior cruciate ligament reconstruction: a systematic review of overlapping meta-analyses. *Arthroscopy*. 2015;31(2):364-72.

9. Anhang

9.1. Abkürzungsverzeichnis

ADSC	adipo derived stem cells
BMP-13	bone morphogenetic protein 13
bp	Basenpaare
Ca ²⁺	Kalziumionen
Cl ⁻	Chloridion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C _t -Wert	cycle threshold-Wert, Wert der den Beginn von exponentiellen Wachstums in der PCR beschreibt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
cDNA	complementary DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF1A	elongation factor 1-alpha
EM	elastic Modulus
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor basic (146 aa)
G1	Gruppe 1
G2	Gruppe 2
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF-5	growth/differentiation factor 5
H ₂ O	Wasser
IGF-1	insulin-like growth factor 1
K	Kontrollgruppe
M.	Musculus
m:w	Männlich:weiblich
MSC	mesenchymal stemcells
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MRT	Magnetresonanztomograph

MW	Mittelwert
NGF	Nerve Growth Factor
NSAR	nicht steroidalen Antirheumatika
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reactio
PDGF	platelet derived groth factors
PRP	platlet rich Plasma
RM	Rotatorenmanschette
RMR	Rotatorenmanschettenruptur
RNA	ribonucleic acid
mRNA	messenger RNA
SABW	Standardabweichung
SCX	Scleraxis
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TGF- β	transforming growth factor beta
TM	Tenomodulin
TTE	Tendon Tissue Engineering
UTS	Ultimate tensile stress
VEGF	Vaskular Endothelial Growth Factor
*	Signifikanz mit $p < 0,05$
**	Signifikanz mit $p < 0,01$
***	Signifikanz mit $p < 0,001$

9.2. *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Rechte Schulter a) von ventral b) von dorsal aus (3)	7
Abbildung 2: Rechte Schulter von lateral aus (3).....	7
Abbildung 3: Die Schulter von lateral aus (3).....	9
Abbildung 4: Verlauf der Heilung (aus (23))	11
Abbildung 5: Schematischer Aufbau einer Sehne (aus (37))	14
Abbildung 6: Histologischer Schnitt durch eine Sehne (aus (38))	15
Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme Tenozyt (aus (38))	15
Abbildung 8: Fibroblasten Tag 0 6x5-fache Vergrößerung	35
Abbildung 9: Fibroblasten Tag 0 6x10-fache Vergrößerung	35
Abbildung 10: Fibroblasten Tag 0 6x20-fache Vergrößerung	35
Abbildung 11: Fibroblasten Tag 0 6x32-fache Vergrößerung	35
Abbildung 12: Gruppe 1 Tag 3 6x5fache Vergrößerung.....	36
Abbildung 13: Gruppe 2 Tag 3 6x10fache Vergrößerung.....	36
Abbildung 14: Gruppe 1 Tag 3 6x20fache Vergrößerung.....	36
Abbildung 15: Kontrolle Tag 3 6x32fache Vergrößerung	36
Abbildung 16: Kontrolle Tag 7 6x5fache Vergrößerung	37
Abbildung 17: Kontrolle Tag 7 6x10fache Vergrößerung	37
Abbildung 18: Gruppe 1 Tag 7 6x5fache Vergrößerung.....	37
Abbildung 19: Gruppe 1 Tag 7 6x10fache Vergrößerung.....	37
Abbildung 20: Gruppe 2 Tag 7 6x5fache Vergrößerung.....	37
Abbildung 21: Gruppe 2 Tag 7 6x10fache Vergrößerung.....	37
Abbildung 22: Kontrolle Tag 7 6x20fache Vergrößerung	39
Abbildung 23: Kontrolle Tag 7 6x32fache Vergrößerung	39
Abbildung 24: Gruppe 1 Tag 7 6x20fache Vergrößerung.....	39
Abbildung 25: Gruppe 1 Tag 7 6x32fache Vergrößerung.....	39
Abbildung 26: Gruppe 2 Tag 7 6x20fache Vergrößerung.....	39
Abbildung 27: Gruppe 2 Tag 7 6x32fache Vergrößerung.....	39
Abbildung 28: Kontrolle Tag 10 6x5fache Vergrößerung	41
Abbildung 29: Kontrolle Tag 10 6x10fache Vergrößerung	41
Abbildung 30: Gruppe 1 Tag 10 6x5fache Vergrößerung.....	41
Abbildung 31: Gruppe 1 Tag 10 6x10fache Vergrößerung.....	41
Abbildung 32: Gruppe 2 Tag 10 6x5fache Vergrößerung.....	41
Abbildung 33: Gruppe 2 Tag 10 6x10fache Vergrößerung.....	41

Abbildung 34: Kontrolle Tag 10 6x20fache Vergrößerung	43
Abbildung 35: Kontrolle Tag 10 6x32fache Vergrößerung	43
Abbildung 36: Gruppe 1 Tag 10 6x20fache Vergrößerung	43
Abbildung 37: Gruppe 1 Tag 10 6x32fache Vergrößerung	43
Abbildung 38: Gruppe 2 Tag 10 6x20fache Vergrößerung	43
Abbildung 39: Gruppe 2 Tag 10 6x32fache Vergrößerung	43
Abbildung 40: Zellzahl an Tag 3,7 und 10	45
Abbildung 41: Zellzahl an Tag 3	46
Abbildung 42: Zellzahl an Tag 7	47
Abbildung 43: Zellzahl Tag 10	48
Abbildung 44: Extinktionsdifferenz an Tag 1,3,7 und 10	49
Abbildung 45: Extinktion an Tag 1	50
Abbildung 46: Extinktion an Tag 3	51
Abbildung 47: Extinktion an Tag 7	52
Abbildung 48: Extinktion an Tag 10	53
Abbildung 49: Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von GAPDH, Scleraxis (SCX) und Tenomodulin (TM)	55
Abbildung 50: Tabelle der Ratios der GAPDH Ct-Mittelwerte	56
Abbildung 51: Genexpression GAPDH	57
Abbildung 52: Tabelle der Ratios der Kollagen Typ I Ct-Mittelwerte	58
Abbildung 53: Genexpression Kollagen Typ I	58
Abbildung 54: Tabelle der Ratios der Kollagen Typ III Ct-Mittelwerte	59
Abbildung 55: Genexpression Kollagen Typ III	60
Abbildung 56: Tabelle der Ratios der Tenascin C Ct-Mittelwerte	61
Abbildung 57: Genexpression Tenascin C	61
Abbildung 58: Tabelle der Ratios der Decorin Ct-Mittelwerte	62
Abbildung 59: Genexpression Decorin	63
Abbildung 60: Tabelle der Ratios der Kollagen Typ II Ct-Mittelwerte	64
Abbildung 61: Genexpression Kollagen Typ II	64
Abbildung 62: Tabelle der Ratios der Osteocalcin Ct-Mittelwerte	65
Abbildung 63: Genexpression Osteocalcin	66

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing Volkmar Jansson danke ich, dass ich meine Arbeit in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation absolvieren durfte.

Herrn Prof. Dr. med. Peter Müller danke ich für die Vergabe dieser komplexen Fragestellung, seine kritischen Einwände in Diskussionen, die die Arbeit positiv beeinflussten und seine Geduld.

Ganz besonders danke ich Herrn PD Dr. med. Thomas Niethammer für die hervorragende Betreuung, die sofortige Unterstützungen bei Problemen, die viele Zeit, die er mir geschenkt hat sowie das große menschliche Verständnis in schweren Zeiten.

Herrn Dr. biol. hum. Oliver Betz danke ich für die gute Organisation des Labors und fundierten Rat bei Schwierigkeiten.

Besonders großer Dank gebührt Frau Elke Luxenburger, die mich mit viel Empathie und Liebenswürdigkeit in das Labor und die Methoden einführte. Dabei war sie stets meine erste Ansprechpartnerin und hat ganz großen Anteil am Gelingen der Versuche.

Frau Bärbel Schmitt danke ich für ihre Freundlichkeit mit der sie mich an ihrem riesigen Erfahrungsschatz teilhaben ließ.

Ein weiterer Dank geht an Frau B.Sc. Julia Redeker für ihre stets kompetente Unterstützung.

Den gesamten Doktoranden im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie möchte ich für das kollegiale Arbeitsklima und die gegenseitige Hilfe danken.

Für die allumfassende Unterstützung als Stipendiat bedanke ich mich bei der Hanns-Seidel-Stiftung.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei meiner Mutter, die wegen ihres plötzlichen und tragischen Todes leider den Abschluss meiner Arbeit nicht mehr erlebt, für die riesige Kraft und den großen Mut, welche sie mir gab. Ebenso möchte ich meinem Vater und meinem Bruder für ihre Unterstützung danken. Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Schwester, die auch in schwersten Zeiten ein kräftiger Anker für mich war und mir neuen Antrieb gab.

Eidesstattliche Versicherung

Bendiks, Martin

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Stimulation von Fibroblasten zu Tenozyten mit Wachstumsfaktoren

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München 18.02.2019

Martin Bendiks